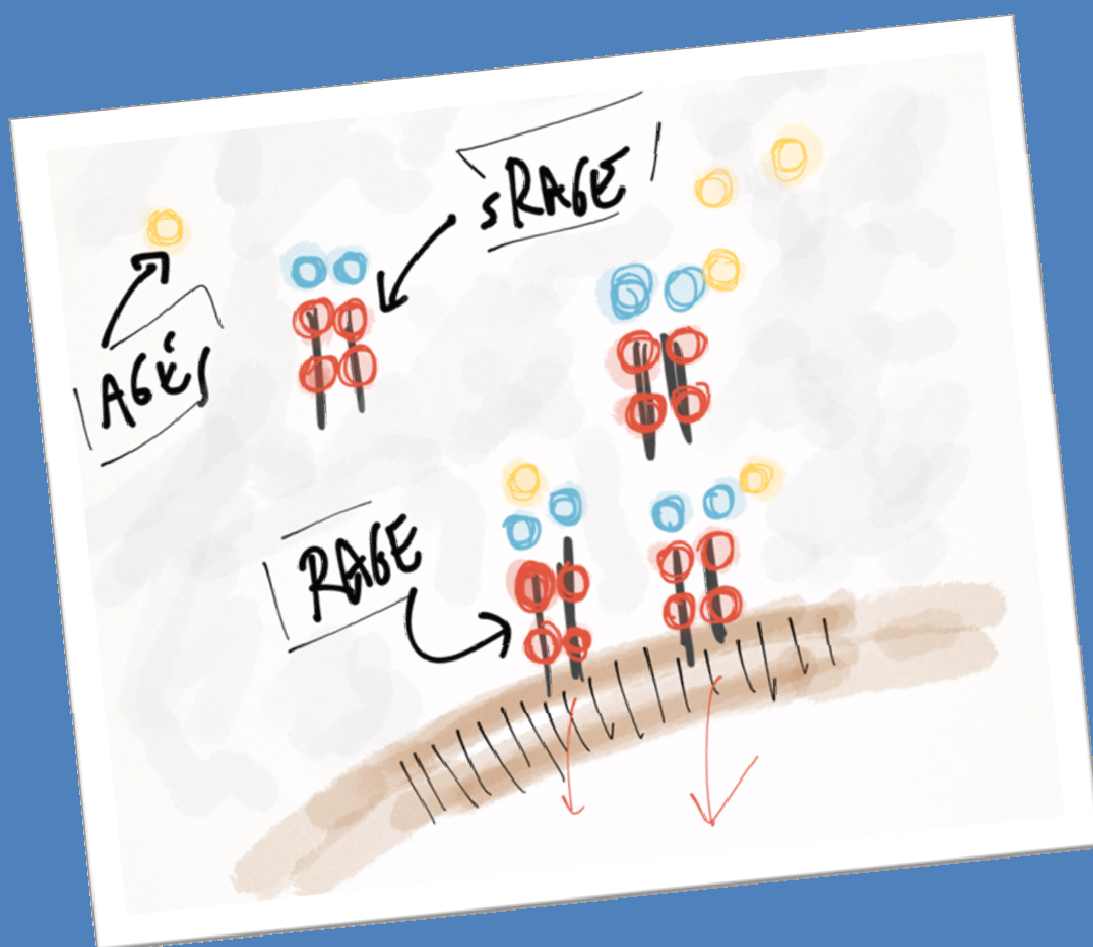


PAPEL DEL RECEPTOR DE PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICOSILACIÓN EN NIÑOS CON TRATAMIENTO HOSPITALARIO POR NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

Alberto García-Salido



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**“PAPEL DEL RECEPTOR DE PRODUCTOS
AVANZADOS DE GLICOSILACIÓN EN NIÑOS CON
TRATAMIENTO HOSPITALARIO POR NEUMONÍA
ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD”**

Alberto García-Salido



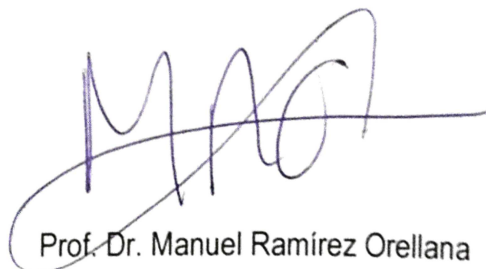
El Prof. Dr. Juan Casado Flores y el Prof. Dr. Manuel Ramírez Orellana,

Certifican que la tesis doctoral que lleva por título "*PAPEL DEL RECEPTOR DE PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICOSILACIÓN EN NIÑOS CON TRATAMIENTO HOSPITALARIO POR NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD*" de la que es autor Don Alberto García Salido, licenciado en Medicina, se ha realizado en su totalidad en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, bajo nuestra supervisión y estimamos que reúne los requisitos necesarios para optar al título de doctor, destacando la contribución positiva del planteamiento propuesto tal y como se refleja en las conclusiones alcanzadas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el certificado en Madrid a 16 de diciembre 2015.



Prof. Dr. Juan Casado Flores



Prof. Dr. Manuel Ramírez Orellana

Este trabajo de tesis se ha desarrollado en el marco del proyecto de investigación en salud con título "*Neumonía adquirida en la comunidad y RAGE: ¿nuevo marcador de gravedad en el paciente pediátrico?*" financiado por el Instituto de Salud Carlos III para el periodo 2012-2014 (BOE número 45, orden SCO/523/2008, expediente PI11/00066).

Agradecimientos

Cuando uno se aproxima a leer una tesis suele comenzar por estas líneas. Desde la curiosidad nos acercamos a los agradecimientos porque estos dan vida, contexto, a todo lo que viene después. Incluso alguno puede considerar que los agradecimientos son las verdaderas conclusiones. Al fin y al cabo en un proyecto como la tesis se investiga sobre algo, para terminar investigando a la persona a través de las preguntas que se ha hecho.

Desde mi punto de vista este trabajo es un viaje, y en los viajes a veces el paisaje importa más que lo que se ve una vez se llega a destino. Así se puede decir que esta tesis comenzó en una terraza, en Getafe, en casa de mis abuelos y tras una encendida conversación sobre la muerte entre un niño de 4 años y una anciana de más de noventa.

He tenido la suerte de compartir este trayecto con mucha gente, que en sus travesías particulares me han acompañado durante un tramo largo, corto o, en algunos casos, aún por definir. Así, Vanesa soportó mi primer año en el laboratorio para enseñarme que para saber primero hay que ignorar. Gustavo ha sido paciente y me ha prestado su sabiduría cuando yo ignoraba, y sus oídos cuando necesitaba pensar en alto lo que a veces hay que reposar en silencio. África, Sara y Julia me abrieron las puertas del laboratorio y me han dejado hacer copia hasta de las llaves de su amistad. Antonio y su equipo me inyectaron las ganas de cambiar las cosas viendo la investigación como una mano más con la que capturar la enfermedad. Ana, Mabel, Montse, Amelia y María Ángeles han sido mi refuerzo intensivo, ellas han entendido el por qué y el para qué. Gonzalo es un compañero de ruta, con caminos que se separan después de muchas aventuras, pero con una forma parecida de caminar. Ricardo y todo lo que rodea, me han hecho mejor médico y sobre todo, mejor persona, porque en tiempos de citometría siempre es necesario saber quién eres y hacia dónde vas.

Obviamente en los viajes uno necesita de mapa, para no perderse o no dejarse llevar. Por suerte yo he tenido dos mentores complementarios que han hecho más fácil la travesía. Juan ha estado ahí desde que empecé la residencia. Exigente, sincero y cercano. Un amigo que

ha evitado que me perdiera en este lugar extraño que a veces es la vida y, por extensión, la medicina. Manuel se añadió a la hoja de ruta con una conversación inolvidable en el despacho de Juan. También exigente, Manuel me ha enseñado cómo de compleja es la sencillez. Me ha animado a no tirar de atajos, porque lo importante no es llegar rápido sino sobre todo llegar.

Pero sin duda en este viaje lo más importante es la vida, que lo es todo, y la vida se hace poco a poco con los que están en el asiento de al lado. Mis padres y hermanos han tolerado todos los pasos en falso. Sin ellos no habría podido llegar a ninguna meta. Saben quién soy y lo que no debo llegar a ser. Ellos junto con el resto de mi familia, han motivado desde siempre las ganas de encontrar respuestas a las preguntas.

Y mi mujer e hijos, a los que pido disculpas por mirar el reloj para quitarles tiempo a su tiempo. Son la razón por la que me muevo y no quiero llegar a ningún sitio sin ellos. Diego e Ismael me dan siempre el punto y seguido al entrar en casa. Sin duda han hecho de mí un nuevo yo. Pilar, mi pilar, sin ella no habría viaje ni ganas de hacerlo. Porque me escucha, me entiende, me orienta y me completa. Te doy las gracias por ser la sinceridad y el amor que no se encuentra, por ser la equis que marca mi tesoro. Te doy las gracias por todo lo que fuiste, eres y serás.

En definitiva espero que este trabajo sea una aventura que continua tras el punto y final, por eso agradecer es un verbo que para un viaje como este prefiero conjugarlo ahora en presente para luego dejarlo reposar en participio.

Os agradezco a todos y cada uno por lo pasado y os estaré siempre agradecido por lo que va a pasar... porque esto, querido lector de agradecimientos, no ha hecho más que empezar.

Madrid, "casa nueva", 12 de diciembre de 2015.

“Do.

Or do not.

There is no try.”

Yoda, “The Empire Strikes Back”

A mis padres, por darme la oportunidad de ser.

A Pilar, por hacerme ser en realidad.

Índice

I. Introducción	- 25 -
II. Neumonía adquirida en la comunidad en pediatría	- 29 -
1. Epidemiología	- 31 -
2. Clínica y tipos de neumonía	- 34 -
2.1 NAC bacteriana	- 34 -
2.2 NAC atípica	- 35 -
3. Diagnóstico	- 36 -
3.1 Estudios analíticos	- 36 -
3.2 Estudios de imagen.....	- 36 -
3.3 Estudios microbiológicos.....	- 37 -
4. Tratamiento	- 39 -
4.1 NAC típica	- 40 -
4.2 NAC atípica	- 40 -
4.3 NAC no clasificable o indiferenciada.....	- 40 -
5. Complicaciones	- 41 -
5.1 Derrame pleural	- 41 -
5.2 Abscesificación	- 45 -
III. Receptor de productos avanzados de glicosilación.....	- 47 -
1 RAGE: expresión y unión a ligandos.	- 50 -
2 RAGE, inflamación y ligandos en contexto de NAC	- 52 -
3 RAGE y sRAGE: dos isoformas para dos posibles funciones.	- 54 -
4 RAGE y sRAGE en la población pediátrica	- 58 -
4.1 Intensidad de fluorescencia de RAGE	- 58 -
4.2 sRAGE	- 60 -
5 Eje RAGE: justificación sobre su posible papel en la NAC.....	- 62 -
6 Eje RAGE y NAC, consideraciones para este trabajo	- 66 -
6.1 Antecedentes de enfermedad	- 66 -

6.2 Células blancas y plaquetas	- 68 -
6.3 Reactantes de fase aguda	- 71 -
6.4 Pruebas de imagen y evolución clínica.....	- 72 -
IV. Hipótesis y objetivos	- 75 -
1. Hipótesis	- 77 -
2. Objetivos	- 77 -
2.1 Objetivos primarios:	- 77 -
2.2 Objetivos secundarios:.....	- 78 -
V. Material y métodos.....	- 79 -
1. Diseño y sujetos de estudio	- 81 -
2 Seguimiento clínico	- 83 -
3. Recogida y procesamiento muestras.....	- 84 -
4. Tipificación de la población aislada de PBMCs	86
5. Determinación de los niveles de los niveles de sRAGE	87
6. Análisis estadístico.....	88
VI. Resultados	89
1. RAGE y sRAGE en controles sanos	91
1.1 Análisis de los valores de sRAGE e inmunofluorescencia	93
1.2 Distribución de sRAGE en función del género	94
1.3 Distribución de sRAGE en función de la edad	95
1.4 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función del género	96
1.5 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función de la edad	97
1.6 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función del género	100
1.7 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función de la edad	100
2. RAGE y sRAGE: análisis descriptivo de casos.....	102

2.1 Correlación entre los valores de sRAGE e inmunofluorescencia media de RAGE en las células mononucleares de sangre periférica	102
2.2 Distribución de sRAGE en función del género	103
2.3 Distribución de sRAGE en función de la edad	104
2.4 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función del género	105
2.5 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función de la edad	106
2.6 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función del género	107
2.7 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función de la edad	108
3. RAGE y sRAGE: controles versus casos.....	110
3.1 Análisis de sanos y casos, diferencias epidemiológicas	110
3.2 Análisis de sanos y casos, distribución de las variables a estudio.....	112
3.3 Comparativa sanos vs casos de los valores de sRAGE, IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y ratios.	112
4. RAGE y sRAGE: análisis en los casos	115
4.1 Antecedentes personales.....	116
4.2 Ingreso previo por neumonía versus primer ingreso	117
4.3 Días de fiebre	118
4.4 Antibioterapia	119
4.5 Diagnóstico viral.....	120
4.6 Pruebas de imagen	122
4.7 Tipo de neumonía al ingreso.....	126
4.8 Motivo de ingreso.....	130
4.9 Leucocitos	131
4.10 Neutrófilos	135
4.11 Plaquetas	136
4.12 Proteína C Reactiva	138
4.13 Estudio analítico de los casos: evolución global durante el ingreso.....	139

4.14 Estudio analítico de los casos: análisis en función de los valores de la mediana.....	145
4.15 Estudio analítico de los casos: pacientes con ingreso en UCIP.....	147
VII. Discusión	151
1. Eje RAGE: consideraciones sobre edad y género.....	155
2. Intensidad de fluorescencia media de RAGE en NAC.....	156
3. sRAGE en la NAC.....	158
4. Eje RAGE, papel en la NAC.....	160
5. Utilidad de sRAGE e IFM de RAGE como biomarcador en contexto de NAC.....	171
VIII. Limitaciones	173
IX. Conclusiones.....	177
X. Anexos	181
1. Anexo 1	183
1. Descripción clínico-evolutiva de los casos	183
2. Casos con ingreso en UCIP	192
3. Comentario clínico sobre los casos.....	196
Anexo 2, “Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric bronchiolitis: a pilot study”, García-Salido A, Oñoro G, Melen GJ, Gómez-Piña V, Serrano-González A, Ramírez-Orellana M, Casado-Flores J.Lung. 2015 Feb;193(1):19-23. doi: 10.1007/s00408-014-9663-9. Epub 2014 Oct 30.....	203
Bibliografía.....	211

Glosario

- NAC: neumonía adquirida en la comunidad.
- RAGE: receptor de productos avanzados de glicosilación.
- sRAGE: forma soluble del receptor de productos avanzados de glicosilación.
- esRAGE: forma endosecretora soluble del receptor de productos avanzados de glicosilación.
- VRS: virus respiratorio sincitial.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- i.v.: intravenoso.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- S100: calgranulinas.
- HMGB1: *High-Mobility Group protein Box-1* o proteína de alta movilidad grupo caja-1.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ARN: ácido ribonucleico.
- AGE: *Advanced Glycation End products* o productos avanzados de glicosilación.
- NF κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* o factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- MAPK: *Mitogen-Activated Proteína Kinases* o proteínas quinasa activadas por mitógenos.
- PI3K: *Phosphatidylinositol 3-Kinases* o fosfatidilinositol 3 quinasa.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
- IL-6: interleucina 6.
- CML: carboximetil lisina.
- mARN: ARN mensajero.
- PBMCs: células mononucleares de sangre periférica o monocitos.
- IFM: intensidad de fluorescencia media.
- ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
- UCIP: unidad de cuidados intensivos pediátricos.

I. Introducción

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) se define como toda infección aguda del parénquima pulmonar provocada por un microorganismo situado fuera del ambiente hospitalario en un individuo inmunocompetente. De este modo es condición necesaria que no haya sido hospitalizado en los 7 días previos al inicio de los síntomas o bien que la clínica comience de forma inequívoca en las primeras 48 horas de hospitalización^{1, 2}.

La NAC representa actualmente la primera causa de mortalidad infecciosa en niños menores de cinco años a nivel mundial. A su vez constituye una de las causas más frecuentes de infección bacteriana grave en la infancia. Aproximadamente el 50% de las NAC son producidas por bacterias (*Streptococcus pneumoniae* es el patógeno más frecuente, estando implicado en hasta el 30% de los casos) siendo los virus la segunda causa de mayor prevalencia²⁻⁴.

Alrededor de un 7-15% de los pacientes afectados por NAC requieren ingreso hospitalario constituyendo de este modo una causa importante de consumo de recursos sanitarios⁵. Resulta de gran interés entender en profundidad los mecanismos moleculares implicados en la respuesta del huésped en el contexto de la NAC. Este conocimiento podría permitir tanto un diagnóstico precoz de la NAC como la anticipación de sus complicaciones derivando en una actuación clínica más eficaz, con quizá menor tiempo de ingreso, y un mayor número de tratamientos domiciliarios.

Actualmente se combinan criterios clínicos, analíticos y microbiológicos en el diagnóstico y tratamiento de la NAC. Estos parámetros se aplican en base a estudios realizados en grandes poblaciones y muestran relación con la etiología del cuadro, la posible necesidad de antibioterapia, la gravedad clínica al diagnóstico y la posterior respuesta al tratamiento³. No permiten sin embargo establecer una relación directa y adecuada con la evolución, lo cual obliga

al clínico en gran cantidad de ocasiones a actuar en función de las complicaciones ya desarrolladas sin poder anticiparse a ellas.

En definitiva existe la necesidad de ampliar el conocimiento de los mecanismos de inflamación del huésped que influyen en una respuesta inmune eficaz frente a los agentes infecciosos. Disponer de marcadores moleculares pronósticos individualizados que deriven en un abordaje terapéutico más eficaz resulta un objetivo fundamental. Este trabajo prospectivo observacional estudia el posible papel del receptor de productos avanzados de glicosilación (RAGE) en el contexto de NAC. Se considera de interés conocer el estado y modificaciones de esta molécula dada su actividad y papel ya descrito en otras enfermedades respiratorias. A su vez la modificación de sus valores podría tener interés no sólo como factor predictor sobre la evolución clínica sino como elemento útil en cuanto a la información que pueda ofrecer sobre la etiología del cuadro y daño pulmonar subyacente^{6, 7}.

II. Neumonía adquirida en la comunidad en pediatría

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una infección aguda del parénquima pulmonar que afecta a pacientes no hospitalizados y que se caracteriza por la aparición de fiebre y/o síntomas respiratorios, junto con la presencia de infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax^{8, 9}.

La NAC se clasifica clásicamente en tres grandes síndromes: típica o bacteriana, atípica (producida por virus o bacterias atípicas) y no clasificable o indiferenciada (casos que no cumplen criterios que permitan incluirlos en ninguno de los 2 primeros grupos). En ocasiones es difícil diferenciar claramente los tipos de NAC, por lo que se han establecido criterios diagnósticos basados en la suma de criterios clínicos, analíticos y radiológicos que faciliten la orientación diagnóstica (Tabla 1).

- | | |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Fiebre > 39° C de aparición brusca. |
| 2. | Dolor pleural (torácico o epigástrico). |
| 3. | Auscultación pulmonar focal (crepitantes, hipoventilación o soplo tubárico). |
| 4. | Leucocitosis $\geq 12.000/\text{mm}^3$ con neutrofilia $\geq 6.000/\text{mm}^3$ |
| 5. | Radiografía de tórax con imagen de consolidación. |

NAC típica: ≥ 3 criterios; NAC atípica: 0 criterios; NAC indeterminada: 1-2 criterios.

Tabla 1. Criterios para la clasificación de neumonía adquirida en la comunidad al ingreso¹⁰.

1. Epidemiología

La NAC es una de las infecciones más frecuentes de la infancia, observándose entre 1.000 y 4.000 casos/100.000 niños/año. Esta incidencia presenta variaciones según la edad, afectando más frecuentemente a niños entre 1 y 5 años¹¹. Aunque su mortalidad es baja en países desarrollados, asocia una elevada morbilidad precisando hospitalización el 7-15% de los niños afectados¹¹. A pesar de que existen pocos datos sobre incidencia de la NAC en niños¹², recientemente ha sido descrito un aumento de las formas tanto complicada como no complicadas así como de la incidencia del derrame pleural paraneumónico¹³.

Los agentes infecciosos que causan NAC en la infancia son numerosos (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, virus respiratorios como el virus respiratorio sincitial o VRS, parainfluenza, influenza, adenovirus...). La frecuencia de cada uno de ellos varía de forma importante en función de la edad del paciente y la necesidad de tratamiento hospitalario (Tabla 2)¹². De este modo si agrupamos los patógenos causantes de NAC en base a la necesidad de ingreso hospitalario se observa que el tratamiento domiciliario es más prevalente en patógenos causantes de neumonía atípica^{14, 15}. Por otro lado, en niños que precisan ingreso por compromiso respiratorio o por afectación del estado general, el neumococo y el VRS constituyen los principales agentes causales^{14, 15}.

Microorganismos causales (niños previamente sanos)		
Grupos de edad	Frecuentes	Menos frecuentes
0 a 1 mes	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i>	Otras enterobacterias. Virus. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Candida</i> sp
De 1 a 3 meses	Virus respiratorios <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b <i>Bordetella pertussis</i> . <i>Chlamydia trachomatis</i> Enterobacterias
De 4 meses a 4 años	Virus respiratorios <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5 o más años	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Virus respiratorios <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Tabla 2. Agentes causantes de NAC en función de la edad^{2, 12, 16-18}.

2. Clínica y tipos de neumonía

La clínica asociada a los diferentes cuadros de neumonía en función de su etiología típica o atípica se describe en la siguiente tabla:

Típica o bacteriana (3 de 7 criterios)	Atípica o no bacteriana (5 de 5 criterios)
<ol style="list-style-type: none">1. Fiebre elevada, de comienzo brusco.2. Tos productiva.3. Dolor costal, abdominal, en hombro o meningismo.4. Auscultación pulmonar: estertores localizados, hipoventilación, soplo tubárico.5. Radiografía de tórax: consolidación, broncograma aéreo, derrame pleural.6. Leucocitosis ($>15000/\mu\text{l}$) con neutrofilia ($>10000/\mu\text{l}$) y elevación de reactantes de fase aguda ($\text{PCR} \geq 4 \text{ mg/dl}$).7. Herpes labial.	<ol style="list-style-type: none">1.No fiebre alta ni de aparición brusca. Buen estado general.2.Síntomas catarrales.3.Auscultación pulmonar: ausencia de signos de focalidad, estertores difusos.4.Radiografía de tórax: no signos de consolidación.5.Ausencia de leucocitosis y neutrofilia.

Tabla 3. Criterios diagnósticos para neumonía típica o atípica^{2, 12, 16, 17, 19, 20}.

2.1 NAC bacteriana

Se caracteriza por presentar generalmente fiebre elevada de comienzo súbito con escalofríos, afectación del estado general y ocasionalmente presencia de herpes labial. Se puede acompañar de dolor torácico de características pleuríticas y expectoración productiva¹⁵. La auscultación es focal, con presencia en ocasiones de soplo tubárico. Esta forma clásica de presentación puede verse sobre todo en niños mayores, siendo infrecuente en los lactantes y niños pequeños¹⁵. En estos suele presentarse como complicación de una infección respiratoria viral que, tras asociar febrícula o fiebre baja, súbitamente inicia fiebre elevada y empeoramiento del estado general. También puede manifestarse como fiebre sin foco, siendo este tipo de neumonía característica

de la NAC neumocócica¹⁵. La clínica respiratoria suele ser poco llamativa y la tos no está presente o es escasa. Los niños pequeños rara vez refieren dolor costal y siendo frecuente la aparición de meningismo o dolor abdominal que confunden y retrasan el diagnóstico²¹.

2.2 NAC atípica

Se caracteriza por síntomas catarrales de inicio larvado con fiebre moderada, tos seca irritativa, y en ocasiones dificultad respiratoria¹⁷. La auscultación pulmonar es generalizada o inespecífica de características bronquiales, acompañándose en ocasiones de broncoespasmo o signos de hiperreactividad bronquial²¹.

En función de la clínica se puede orientar el diagnóstico etiológico de la NAC atípica:

- NAC viral. Aparece en menores de 3 años habitualmente durante el invierno. Se acompaña de cuadro catarral con febrícula o fiebre moderada, faringitis, coriza, conjuntivitis y en ocasiones síntomas extrapulmonares como exantemas inespecíficos o diarrea¹⁶.
- NAC por bacterias atípicas (*Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae*¹⁶). Afecta habitualmente a niños mayores de 3 años, con presentación subaguda, acompañada de cefalea, mialgias y característicamente de tos seca irritativa y en ocasiones auscultación de broncoespasmo. La NAC por *Mycoplasma pneumoniae* puede asociar síntomas no solo respiratorios (encefalitis, Guillain-Barré, neuritis, anemia hemolítica, miocarditis, eritema exudativo multiforme...).

3. Diagnóstico

3.1 Estudios analíticos

La leucocitosis o la elevación de reactantes de fase aguda son datos que no siempre indican una etiología bacteriana, ya que pueden observarse también en infecciones víricas. Tan solo la presencia de desviación izquierda, con predominio de polimorfonucleares o presencia de formas inmaduras, parece un indicador fiable de etiología bacteriana, siendo por el contrario el predominio linfocitario de etiología viral²¹.

En relación a los reactantes de fase aguda la determinación de la procalcitonina ofrece mayor especificidad que la proteína C reactiva para el diagnóstico diferencial entre NAC bacteriana o vírica (valores mayores de 0,5 ng/ml), aunque es una prueba que no está disponible en todos centros³. La determinación de crioaglutininas resulta positiva en el 50% de las neumonías por *M. pneumoniae*, aunque no son específicas de esta infección. A su vez, la elevación de los eosinófilos es un dato característico de la infección por *Chlamydia trachomatis*.

3.2 Estudios de imagen

No existen características radiológicas que nos permitan diferenciar con total seguridad los diferentes tipos de NAC⁹. La presencia de una condensación lobar en la radiografía de tórax parece ser un indicador razonablemente específico de infección bacteriana²², al igual que lo es la presencia de un derrame pleural³. Sin embargo su ausencia no descarta la infección bacteriana. Los infiltrados intersticiales difusos se asocian frecuentemente a infecciones víricas o atípicas. La presencia de imágenes aireadas (neumatocelos) con múltiples focos de infiltrados alveolares es característica de *Staphylococcus aureus*. La neumonía por *Streptococcus pyogenes*, aunque poco común, es una infección grave que presenta frecuentemente derrame pleural. En los niños más pequeños la condensación focal única es menos frecuente, encontrándose a esta edad un

patrón alveolo-intersticial denominado bronconeumonía cuya etiología pudiera ser igualmente vírica o bacteriana²¹.

3.3 Estudios microbiológicos

Permiten establecer el diagnóstico etiológico de la NAC. Sin embargo, esto es habitualmente difícil y complejo, especialmente en el caso de los patógenos bacterianos causantes de NAC típica²¹.

- Frotis nasofaríngeo: excepto el aislamiento de *Bordetella pertussis*, la presencia de bacterias en cultivo de frotis nasofaríngeo no tiene valor diagnóstico, ya que pueden ser colonizadoras habituales y no indica que sean las responsables del proceso²¹. En el caso de las infecciones víricas, la detección de antígenos virales en frotis nasofaríngeo permite establecer el diagnóstico etiológico y su principal ventaja es la obtención rápida del resultado.
- Hemocultivo: tiene una sensibilidad muy baja (< 20-30%) mostrando poca rentabilidad en pediatría^{9, 21, 23}.
- Cultivo de esputo: el cultivo de esputo es difícil de conseguir en niños, aunque puede dar buenos resultados si se obtiene correctamente. El aislamiento de una bacteria en una muestra adecuada (> 25 leucocitos por campo y <10 células epiteliales) es indicativo de infección bacteriana²¹.
- Detección de antígenos bacterianos: los test rápidos para la detección de antígeno neumocócico en orina y sangre presentan una sensibilidad y especificidad reducida. Un resultado positivo puede ser reflejo de una colonización o de una infección neumocócica reciente en otro lugar diferente al pulmón (otitis, sinusitis...)²¹. La determinación del antígeno de neumococo en líquido pleural tiene una sensibilidad y especificidad similar a la PCR.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): permite la identificación de material genético viral en secreciones respiratorias con una alta sensibilidad y especificidad. Recientemente se han publicado buenos resultados para *Streptococcus pneumoniae*¹⁹.
- Serología: método sensible y específico que determina anticuerpos frente a diversos patógenos (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, virus...). Sus resultados no son lo suficientemente precoces como para influir en decisiones terapéuticas²¹.
- Otras técnicas: en casos graves y de mala evolución la obtención de secreciones traqueobronquiales mediante lavado broncoalveolar o la realización de toracocentesis en niños con derrame pleural permitirán obtener material para cultivo y realización de PCR³.

4. Tratamiento

El tratamiento de la NAC es fundamentalmente empírico⁹, especialmente en los primeros momentos (Tabla 4). Este debe instaurarse basándose en: a) la edad del paciente (relación estrecha entre la edad y la etiología de la NAC); b) características clínico-radiológicas de la NAC; c) gravedad del enfermo; y d) resistencias bacterianas (especialmente neumococo y *Staphylococcus aureus*²⁴).

	Antibiótico	mg/Kg/día	Número de dosis/día	Días	Vía
Patrón típico	Sin ingreso: amoxicilina	80-90	3	7	Oral Intravenoso
	Con ingreso: ampicilina	200	4	7-10	
Alergia a β lactámicos	Sin ingreso: clindamicina	15-40	3-4	7	Oral Intravenoso
	Con ingreso: clindamicina	15-40		7-10	
Fracaso terapéutico	Cefotaxima +/-	150-200	3	7-10	Intravenoso
	Vancomicina	40	4		
Patrón atípico	≤ 3 años	Sin antibiótico			
	> 3 años: azitromicina	10	1	5	Oral
Neumonía no clasificable grave	Cefotaxima +	150-200	3	7-10	Intravenoso
	Claritromicina	15	2		
Neumonía con derrame pleural	Ampicilina	200	4	10	Intravenoso
	Cefotaxima	150-200	3		

Tabla 4. Antibioterapia empírica ante sospecha de neumonía adquirida en la comunidad²⁵.

4.1 NAC típica

El tratamiento de la NAC típica debe ir dirigido fundamentalmente frente el neumococo. En los últimos años, se ha observado en España una disminución en el número de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina¹¹. La inclusión de los serotipos más resistentes en la vacuna heptavalente, así como el incremento en la aparición de nuevos serotipos más sensibles podría explicar este fenómeno^{16, 17}. Sin embargo, algunos autores aconsejan la utilización de dosis mayores de antibiótico en pacientes que precisen ingreso (ampicilina i.v. a 200 mg/kg/día), debido a la reciente aparición en nuestro medio de formas graves con frecuente desarrollo de derrame pleural¹¹. El tratamiento de elección en pacientes que no precisen ingreso será amoxicilina oral a 80 mg/kg/día⁸. *Haemophilus influenzae b* ya no es un patógeno común, por lo cual no es necesaria la administración de ácido clavulánico, salvo en niños no vacunados¹¹.

4.2 NAC atípica

El tratamiento de elección de la NAC atípica a partir de los 4-5 años es claritromicina o azitromicina⁸. Por debajo de esta edad el enfermo puede ser tratado sintomáticamente, excepto si la NAC es moderada o grave o el niño tiene < 6 meses y existe sospecha de infección por *Chlamydia trachomatis*, en cuyo caso se recomienda un macrólido oral o i.v. La duración del tratamiento no está bien definida, utilizándose habitualmente 10 días para claritromicina y 5 días para azitromicina⁸.

4.3 NAC no clasificable o indiferenciada

El tratamiento de la NAC no clasificable en el niño de ≥ 3 años es semejante al de la NAC típica, dado que la etiología neumocócica es difícil de diagnosticar y supone un riesgo a esta edad por su gravedad. En niños mayores de 3 años se instaurará un tratamiento con macrólidos (claritromicina o azitromicina), valorándose el cambio a un betalactámico si no hay

mejoría. Si precisa ingreso, se asociará un antibiótico betalactámico i.v. y un macrólido oral si hay importante compromiso respiratorio⁸.

5. Complicaciones

Alrededor de un 0,6-2% de las neumonías se complican con un derrame pleural tipo empiema. Las bacterias más frecuentemente aisladas en el empiema pleural en niños son el *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Hasta un 20% de los empiemas se asocian con neumonías necrotizantes, lo que antes era frecuente para el *Staphylococcus aureus* ahora lo está siendo para el neumococo. No están claras las causas de esto último, aunque la mayoría de los autores piensa que está en relación con la circulación de nuevos serotipos como el 1, 7F, 3 o 5, cepas muy sensibles pero al mismo tiempo muy virulentas¹⁵. También se ha constatado un incremento del serotipo 19A, segundo en frecuencia a poca distancia del 1 en derrames, pero que al contrario que los citados, presenta más resistencias antibióticas². Los valores elevados de leucocitos, velocidad de sedimentación globular, PCR se correlacionan bien con un mayor riesgo de neumonía necrotizante y otras complicaciones, que implican hospitalizaciones más largas y más posibilidades de necesitar tratamiento quirúrgico²⁶.

5.1 Derrame pleural

El derrame paraneumónico es una complicación infrecuente de las neumonías, su aparición se relaciona con la ocupación de la cavidad pleural por un líquido derivado tanto de la inflamación pleural sobreañadida a la neumonía como de una probable afectación directa de este espacio por el agente causal del cuadro. Según el tipo de líquido acumulado se denomina: exudado, empiema, trasudado, quilotórax y hemotórax (Tabla 5). Su aparición es un signo de gravedad seguro e implica no sólo en evolución tórpida de la infección sino que también será

indicación de un cambio en la terapia antimicrobiana (Tabla 6) y la valoración de la colocación un drenaje pleural para evacuar el derrame²⁶.

Tipo de líquido	Características
Exudado	<ul style="list-style-type: none"> • Criterios de Light: <ul style="list-style-type: none"> – Proteínas pleura/proteínas suero > 0,5 – LDH pleural/LDH plasma > 0,6 – LDH pleura > 200 U/L • Aunque es menos específico, el líquido pleural suele presentar: <ul style="list-style-type: none"> – Proteínas > 3 g/dl (g/100 ml) – Densidad > 1016 – pH* < 7,30 – Glucosa < 60 mg/dL (mg%) – Células > 1.000/mm³ – Colesterol > 60 mg/dl – Albúmina pleura/albumina suero > 1,2 g/dl – Bilirrubina pleura/bilirrubina suero > 0,6
Trasudado	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas pleura/ proteínas suero < 0,5 • LDH pleura < 200 U/L • LDH pleura/LDH plasma < 0,6 Suele tener también: <ul style="list-style-type: none"> • Proteínas < 3 g/dl • pH* normal (superior al plasma) • Células < 1.000/mm³ • Albúmina pleura/albumina suero < 1,2 mg/dl
Empiema	<ul style="list-style-type: none"> • pH* < 7,0 • Leucocitos > 15.000/mm³ • Glucosa < 40 mg/dl • Cultivo positivo • LDH > 1.000 U/L
Quilotórax	<ul style="list-style-type: none"> • pH alcalino • Densidad >1.016 • Colesterol normal o disminuido • Presencia de quilomicrones • Triglicéridos >110 mg/dl • Electrolitos semejantes al plasma • Cultivos negativos (por ser bactericida)

*El pH debe realizarse inmediatamente tras su extracción, en un aparato de gasometría.

Tabla 5. Tipos de derrame pleural en función de las características citoquímicas del líquido drenado^{26, 27}.

Neumonía adquirida en la comunidad	Neumonía adquirida en el hospital o secundaria a trauma, cirugía o aspiración
Cefuroxima 150 mg/kg/d i.v. c/8 horas (máx. 6 g/d)	
Amoxicilina-clavulánico 100-150 mg/kg/d c/6 horas (máx. 2 g/d)	Antibiótico de amplio espectro que incluyan bacilos gram negativos:
Cefotaxima 200-300 mg/kg/d c/6-8 horas (máx. 12 g/d) (de elección)	Ceftazidima 150 mg/kg/d i.v. c/8 horas (máx. 6 g/d)
Ceftriaxona 100 mg/kg/d c/12-24 horas (máx. 4 g/d)	Valorar añadir uno de los tres:
→ Alérgicos a las penicilinas: clindamicina 20-40 mg/kg/6-8 horas (máx. 3 g/d) i.v.	Amikacina 15-20 mg/kg/d i.v c/24 horas (máx. 1,5 g/d).
→ Sospecha de <i>Staphylococcus aureus</i> : cloxacilina 100-150 mg/kg/d/6-8 h i.v.	Gentamicina 5-7,5 mg/kg/d i.v. c/24 horas (máx. 300 mg/d).
→ Neumonía necrotizante: clindamicina 20-40 mg/kg/6-8 horas (máx. 3 g/d) i.v y Cefotaxima 200-300 mg/kg/d c/6-8 horas (máx. 12 g/d).	Tobramicina 6-7,5 mg/kg/d i.v. c/24 horas (máx. 300 mg/d).

Tabla 6. Tratamiento empírico del derrame paraneumónico^{1, 2, 12, 16-18}.

La radiografía de tórax permite detectar la presencia de derrame pleural, siendo un signo común el pinzamiento del seno costofrénico ipsilateral al infiltrado o consolidación (con el paciente en decúbito supino y en acúmulos de mayor entidad se puede ver el llamado “signo del menisco” en el hemitórax afecto o incluso un pulmón “blanco” ante la ocupación de todo el espacio pleural por el derrame). La presencia de este hallazgo no sólo permite diagnosticar la complicación sino que también, en caso de asociar dificultad respiratoria o empeoramiento

clínico paulatino, debe poner sobre aviso para valorar el volumen real de líquido en la cavidad pleural. Para ello la ecografía torácica es la técnica de elección. Esta técnica permitirá no solo estimar el volumen del líquido pleural, sino que también ofrecerá información acerca de la celularidad, presencia de trayectos de fibrina o tabiques y permitirá definir la zona más adecuada para realizar la punción pleural. La inserción del drenaje pleural guiado por ecografía asocia una mayor eficiencia en la realización de la técnica, disminuyendo además las complicaciones con ella²⁷.

Una vez realizado el drenaje pleural la evaluación del líquido drenado añadirá información sobre la etiología del cuadro. Será necesario realizar un análisis citoquímico que aporta datos sobre: 1) Tipo de las células blancas presentes en el espacio pleural 2) Cantidad de glucosa y proteínas en el líquido pleural, relacionado con la inflamación subyacente y la posible presencia de bacterias en el mismo 3) Situación de equilibrio ácido-base, siendo mayor la acidosis cuanto mayor sea la inflamación subyacente 4) Presencia en el líquido pleural de enzimas intracelulares leucocitarias que informan sobre la lisis celular (LDH).

En la evaluación citoquímica del líquido pleural, el pH es el parámetro que tiene una mayor precisión diagnóstica, considerándose un pH menor de 7 como indicativo de empiema. Para su determinación es necesario que la muestra de líquido pleural se obtenga y se transporte en condiciones adecuadas, siendo para ello muy útil la existencia de un sistema de pH-metría en el lugar de la punción²⁷.

Este conjunto de datos aportará información no sólo en relación a la elección de un determinado antimicrobiano, sino que también permitirá anticipar complicaciones. Con intención de simplificar la categorización de los derrames pleurales, y basándose en los datos descritos, se utilizan los criterios de Light. Estos criterios son los más extendidos para diferenciar entre trasudado y exudado. Permiten identificar un exudado en más del 95% de los casos si se cumple

al menos alguno de estos tres criterios: a) proteínas en líquido pleural/proteínas en sangre mayor de 0,5; b) LDH en líquido pleural/LDH en sangre mayor de 0,6; c) LDH en líquido pleural superior a dos tercios de los valores máximos considerados normales (se tiende a considerar valor positivo para exudado superior a 1000 UI/L). Cuando estas determinaciones son equívocas se recomienda recurrir a la medición del colesterol en el líquido pleural, estableciéndose habitualmente el punto de corte entre trasudados y exudados en 60 mg/dl (1,55 mmol/L). Un trasudado no cumple ninguno de estos criterios²⁷.

Si tras la colocación de un drenaje pleural deja de salir líquido y el paciente mantiene fiebre debe realizarse una nueva ecografía para ver si el derrame está tabicado, en cuyo caso se deberá administrar fibrinolíticos, como la uroquinasa o la alteplasa, a través del drenaje pleural. Se encuentra más extendido el uso de uroquinasa hasta lograr la eliminación de los tabiques o, en su defecto, la aparición de líquido serohemático que indicaría irritación de la pleura parietal y visceral del paciente por el fármaco²⁸.

Los antibióticos de elección son la cefotaxima asociando, si existe sospecha clínica o bacteriológica de origen estafilocócico, cloxacilina. En este momento no está indicada en España la vancomicina, ya que las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina de origen comunitario son raras en nuestro país, al contrario de lo que ocurre en EE.UU²⁴.

5.2 Abscesificación

Otra de las complicaciones de la neumonía es la abscesificación necrotizante, excepcional hace unos años, pero que actualmente comienza a observarse con cierta frecuencia, especialmente en la neumonía de origen neumocócico. Es raro que se presente aislada, siendo más habitual que acompañe al derrame pleural. El tratamiento debe ser asociar cefalosporinas de tercera generación y clindamicina por la elevada concentración bacteriana (inóculo). A su vez se realizará monitorización clínica del paciente con intención de descartar

complicaciones como un neumotórax relacionadas con la rotura de la cavidad pulmonar derivada de la infección^{24, 29}.

III. Receptor de productos avanzados de glicosilación

RAGE se caracteriza por primera vez en el año 2006 y supone en la actualidad un área de investigación activa en diversos campos tales como la inmunidad, la oncogénesis y la inflamación³⁰. Es un receptor transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuya estructura se compone de tres dominios extracelulares: una inmunoglobulina tipo V, dos dominios constantes C y una cola citoplasmática. (Figura 1)³¹.

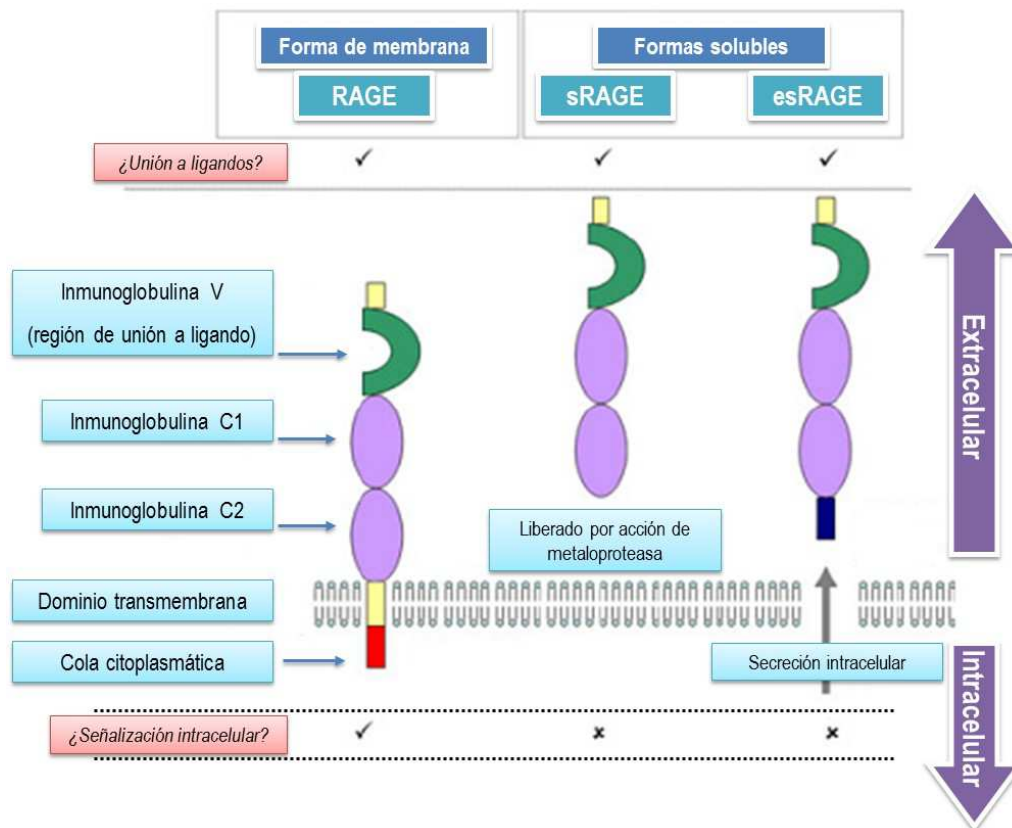


Figura 1 Diagrama que representa los tipos de RAGE. Se destacan las diferencias en su origen, estructura y la capacidad señalización intracelular. De izquierda a derecha RAGE de membrana, sRAGE (liberado mediante acción de la metaloproteasa ADAM10) y esRAGE endógeno (síntesis y secreción directa desde el interior celular)³¹.

El propósito de este trabajo de tesis es estudiar el papel del receptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) y una de sus formas solubles (sRAGE) en la NAC. El eje RAGE podría presentar un papel de importancia en este cuadro influyendo en la inflamación local y sistémica de esta enfermedad. A su vez, y en base a publicaciones recientes³²⁻³⁶, aumentar el conocimiento sobre RAGE podría convertir a esta molécula en un blanco atractivo para la intervención terapéutica. Dicha aplicación ya se está desarrollando tanto en modelos

experimentales como clínicos en procesos tan dispares como la diabetes, el daño renal crónico, las enfermedades inflamatorias crónicas y las infecciones. En todos ellos la influencia y modificación sobre la expresión de RAGE y sus ligandos³⁷⁻⁴¹, ya ocurra esto tanto de forma aguda como crónica ("*hipótesis de dos hits*" de RAGE para la inflamación⁴²; Figura 2), parecen otorgar a esta molécula un papel fundamental en el origen, puesta en marcha y mantenimiento de la inflamación.

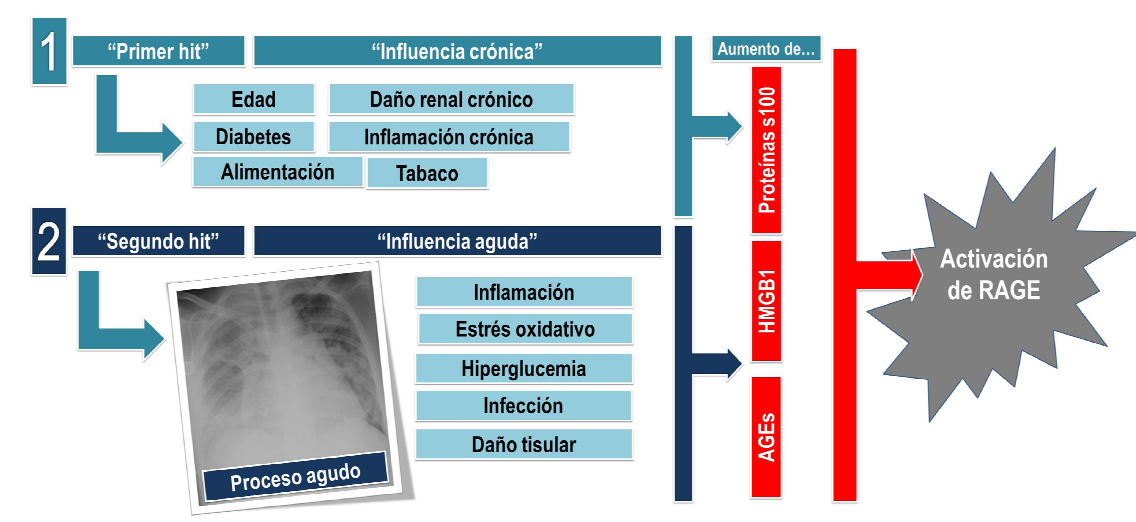


Figura 2. Diagrama que representa los "dos hits" de RAGE en la inflamación. *Primer hit*: papel de RAGE en la inflamación crónica por activación mantenida de esta molécula. Esto se relaciona con el incremento paulatino de sus ligandos a lo largo del tiempo consecuencia de enfermedades o hábitos en el individuo. Se produce aumento de los productos avanzados de glicosilación (AGE), HMGB1 y calgranulinas (proteínas S100). *Segundo hit*: aumento de la actividad de RAGE en contexto de inflamación aguda consecuencia del aumento de sus ligandos a expensas de daño tisular y estrés oxidativo⁴².

1 RAGE: expresión y unión a ligandos.

La expresión del receptor de productos avanzados de glicosilación fue descrita por primera vez en el pulmón. Así se interpretó, en inicio, que este receptor se encontraba de forma constitutiva y prevalente en células alveolares tipo I y en la membrana basolateral de las células epiteliales alveolares de tipo II⁴³. Posteriormente, al incrementarse el conocimiento sobre el comportamiento y localización de esta molécula, se ha observado también su presencia en las células del endotelio vascular, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En todos

estos tipos celulares la expresión y actividad de RAGE parece verse influida de igual modo ante la presencia de los múltiples ligandos inflamatorios que es capaz de reconocer^{44, 45}.

RAGE es de este modo un receptor multiligando capaz de unirse a moléculas de varias familias de proteínas (Figura 3)⁴⁶. Entre ellas destacan las proteínas S100, la proteína de alta movilidad grupo caja-1 o HMGB1 y las proteínas avanzadas de glicosilación o AGEs (ver más adelante). Es conocido que niveles elevados de los ligandos asociados a RAGE son partícipes en fenómenos inflamatorios, de muerte celular y estrés oxidativo. Por esto RAGE ha visto descrito su participación e influencia en enfermedades donde estos hechos aparecen de forma individual o combinada (diabetes mellitus⁴⁷, el Alzheimer⁴⁸, la aterosclerosis³⁷, el daño renal crónica^{49, 50}, la sepsis y el shock séptico^{39, 51}).

El reconocimiento y unión de RAGE a sus ligandos desencadena la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular como NF κ B (*Nuclear κ -light-chain-enhancer of activated B cells*), MAPK (*Mitogen-Activated Proteína Kinases*) y PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinases*). Todas ellas, mediante diversos patrones de expresión y activación, conducen al aumento de citoquinas inflamatorias, proteasas y estrés oxidativo en el medio interno e intracelular del organismo afecto^{52, 53}.

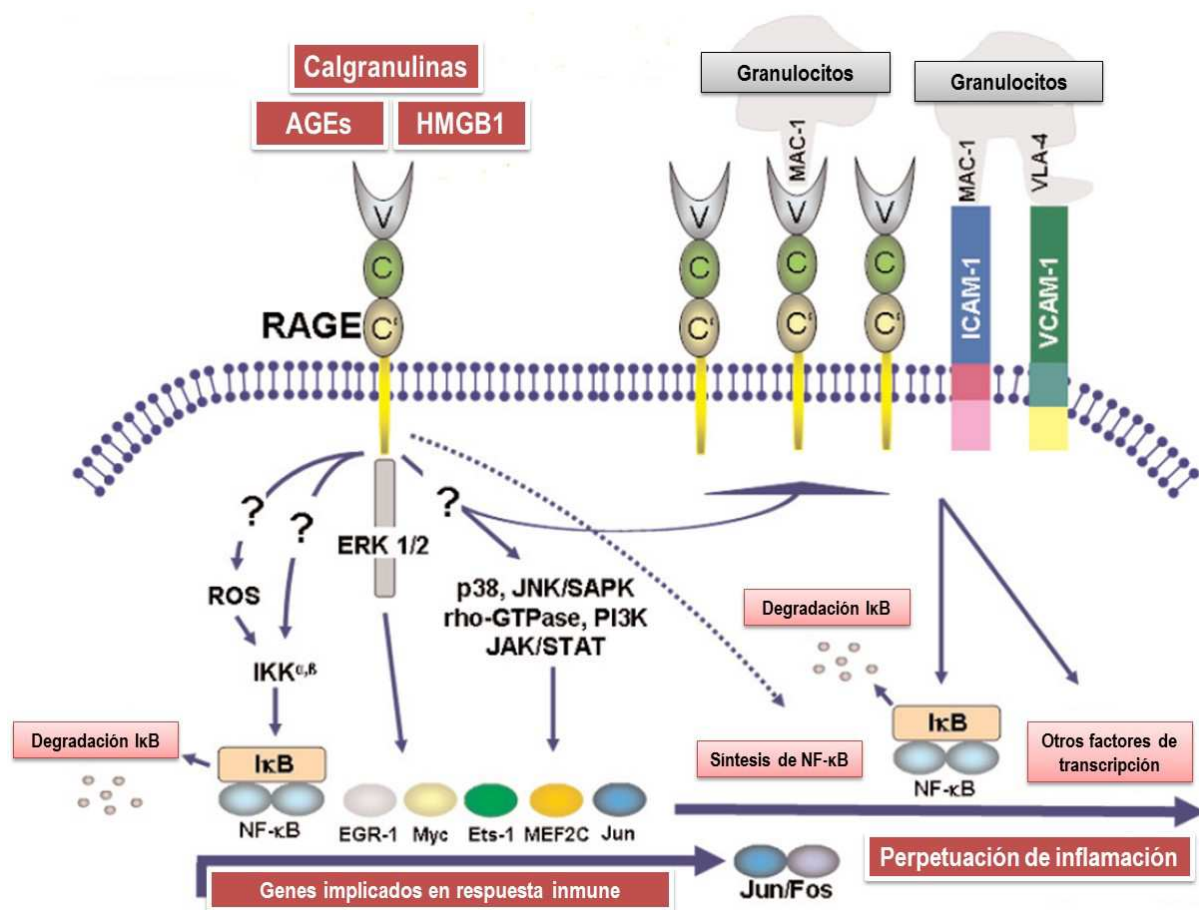


Figura 3. Diagrama que representa la activación de RAGE de membrana. Se muestra su unión a diferentes ligandos y formas celulares. Se indican las vías de señalización intracelular implicadas en la inflamación poniendo especial acento en la activación de NF κ B⁴⁶.

2 RAGE, inflamación y ligandos en contexto de NAC

En la neumonía adquirida en la comunidad, a consecuencia de los mecanismos inmunes activados resultado del insulto infeccioso, se produce la liberación de múltiples citoquinas que condicionan un nuevo perfil inflamatorio en el enfermo. Este hecho, a pesar de originarse en el parénquima pulmonar, influye sobre el total del organismo y las células blancas circulantes⁵⁴⁻⁵⁶.

Se ha demostrado que el receptor de productos avanzados de glicosilación es capaz de reconocer y unirse a los ligandos liberados en procesos inflamatorios que comparten con la NAC estas moléculas proinflamatorias^{46, 57, 58}. En relación a RAGE se deben destacar los siguientes:

- Calgranulinas S100 (S100A8/9, S100B y S100A12)^{59, 60}: grupo de proteínas que se unen al calcio y regulan diversos procesos intracelulares⁶¹. Se ha demostrado la importancia de esta familia en la migración de neutrófilos y macrófagos⁶². S100A8/9 y A12 son secretadas por los macrófagos activados y elevados niveles circulantes de estas proteínas se asocian con enfermedades que cursan con inflamación y muestran incremento en la expresión de citoquinas tales como TNF- α e IL-1 β ⁶².

- Proteína de alta movilidad grupo caja-1 o HMGB1: proteína prototípica de este grupo. HMGB1 se une al ADN nuclear que se libera tanto activamente después de la estimulación con citoquinas como pasivamente durante la muerte celular. Se ha implicado en enfermedades inflamatorias y en modelos de patrones moleculares asociados a daños intracelulares y sistémicos⁶³. Tiene una doble función; 1) Dentro de la célula, HMGB1 se ancla al ADN y regula la transcripción y determinación de la arquitectura cromosómica 2) Fuera de la célula HMGB1 puede servir como una señal de activación del sistema inmune innato representando un marcador de necrosis celular para el sistema inmune innato. Del mismo modo el HMGB1 extracelular también actúa como una potente citoquina proinflamatoria que contribuye también a la patogénesis de enfermedades inflamatorias e infecciosas^{64, 65}.

- Productos avanzados de glicosilación (AGE o *Advanced Glycation End products*): moléculas resultantes de una reacción no enzimática entre azúcares reductores y componentes celulares, incluyendo las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En general, la acumulación de AGEs en el cuerpo se incrementa con la edad y en el contexto de enfermedades inflamatorias de diversa índole^{66, 67}. La unión de AGEs a RAGE regula al alza la expresión de TNF- α , IL-6, y el

óxido nítrico^{66, 68, 69} aumentando así el estrés oxidativo lo cual aumenta el daño tisular y la apoptosis. El AGE más altamente reactivo es la N^ε-carboximetil lisina (CML) que llega incluso a producir daños irreversibles de tejido (Figura 3). Se ha asociado elevadas concentraciones de esta molécula en enfermedades que presentan un gran componente inflamatorio^{70, 71}.

3 RAGE y sRAGE: dos isoformas para dos posibles funciones.

El receptor de productos avanzados de glicosilación se puede encontrar tanto anclado a la membrana celular como en forma soluble y circulante en plasma. Esta expresión diversificada de RAGE depende por un lado del tejido o tipo celular en el que se estudie, y por otro del perfil inflamatorio que lo rodee⁷². Actualmente a pesar de que la función de la forma anclada a membrana parece ser claramente proinflamatoria, la génesis y función de las formas solubles no se entiende completamente.

Las isoformas solubles de RAGE se generan mediante dos rutas diferentes. La isoforma sRAGE aparece en plasma tras la escisión proteolítica del RAGE de membrana mediante una metaloproteasa. La denominada isoforma endógena secretora de RAGE, o esRAGE, se produce tras un corte alternativo del ARN mensajero (mARN) que condiciona una expresión modificada del genoma que codifica el RAGE de membrana (Figura 4)^{73, 74}.

Actualmente ambas formas han sido descritas como marcadores clínicos de utilidad en el cáncer esofágico, la sepsis y la diabetes^{73, 75, 76} y varios autores defienden que la forma predominante en el plasma sería sRAGE, a pesar de que aún no existen resultados concluyentes al respecto.

Acerca de la función de estas isoformas, estudios *in vitro* e *in vivo* otorgan tanto a sRAGE como a esRAGE actividad antiinflamatoria y antagonista de RAGE. La forma en la que esto se lograría no es igual para ambas moléculas. Por un lado sRAGE actuaría como un verdadero antagonista competitivo del RAGE de membrana, siendo así un producto “rápido” y

directo de este (surge al *liberarse* el RAGE de membrana), y por otro esRAGE sería una expresión más tardía, consecuencia del intento de disminuir la inflamación producida vía RAGE mediante una síntesis intracelular modificada del receptor para una posterior liberación de esta isoforma al plasma^{32, 64} (Figura 5). De algún modo, ambas isoformas se comportarían como “*vasos comunicantes*” tanto en función como en presencia con respecto a la forma de membrana. En el contexto de inflamación la forma anclada a membrana vería disminuida su presencia en favor de sRAGE (cambio precoz) y esRAGE (cambio tardío), que capturarían los ligandos de RAGE antagonizando así la función inicial de la forma de membrana.

En este trabajo se decide estudiar el papel del eje RAGE en la NAC mediante la descripción y análisis del RAGE de membrana y el sRAGE circulante. La cinética prevista de las isoformas solubles hace esperar que sea sRAGE la forma predominante en plasma puesto que su presencia es propia de procesos inflamatorios agudos, como es el caso de la NAC, que no hayan desencadenado aún el cambio de expresión génica necesario para la motivar presencia de esRAGE en plasma. En la actualidad ya se ha identificado en otras enfermedades infecciosas un comportamiento de sRAGE semejante al que cabría esperar en la NAC^{6, 7, 32, 33, 43, 64, 77-84}. Es por lo tanto razonable considerar que al estudiar una inflamación con seno fundamental en el tejido pulmonar, dónde su expresión es constitutiva, se debería observar no solo un cambio en el eje RAGE sino también cierta modificación, al comparar con el individuo sano, en la relación entre los valores de sRAGE y la forma anclada a membrana^{32, 84, 85}.

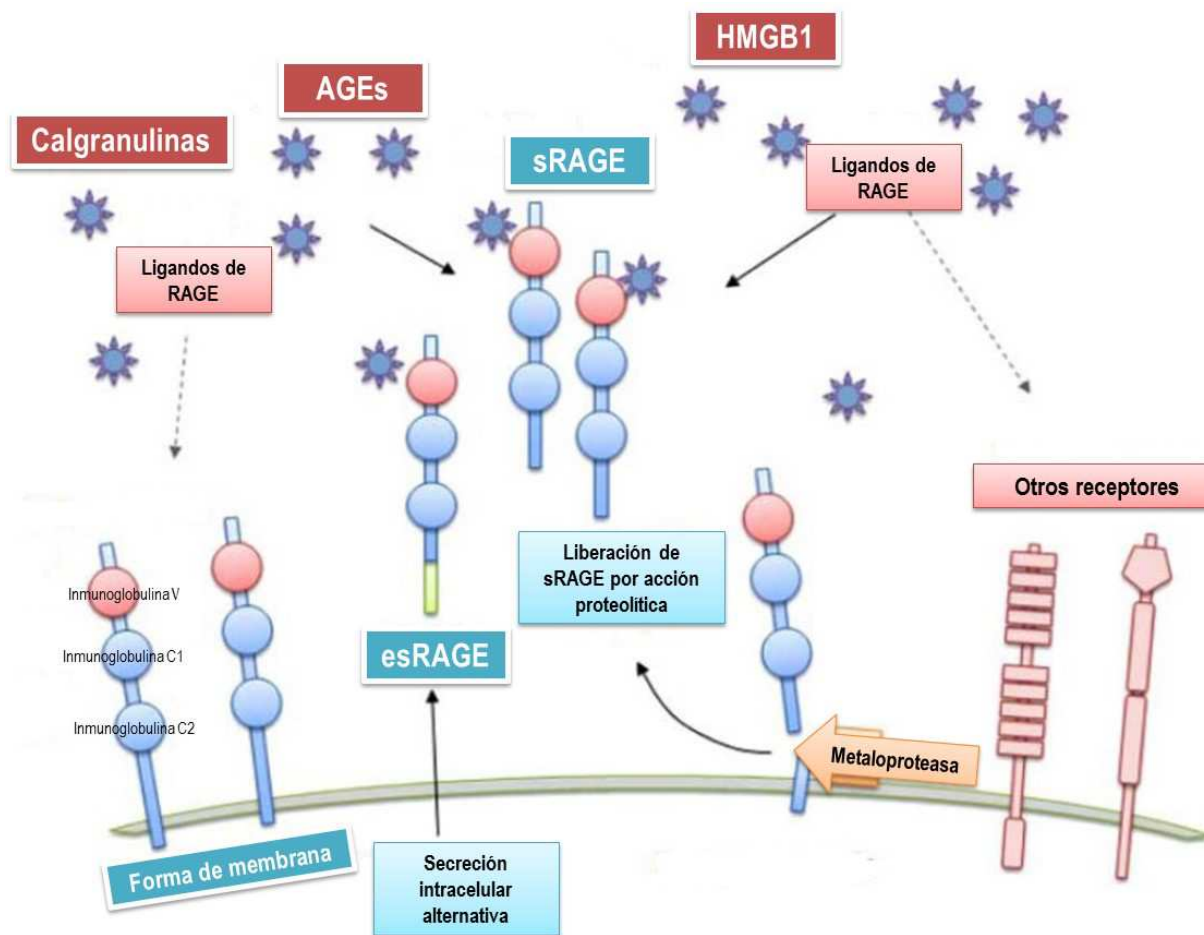


Figura 4. Diagrama que representa la presencia de RAGE de membrana y las diferentes isoformas solubles de RAGE: sRAGE y esRAGE. Se observa cómo ambas formas solubles capturan las mismas moléculas que RAGE al compartir estructura y capacidad de unión a ligandos⁸⁶.

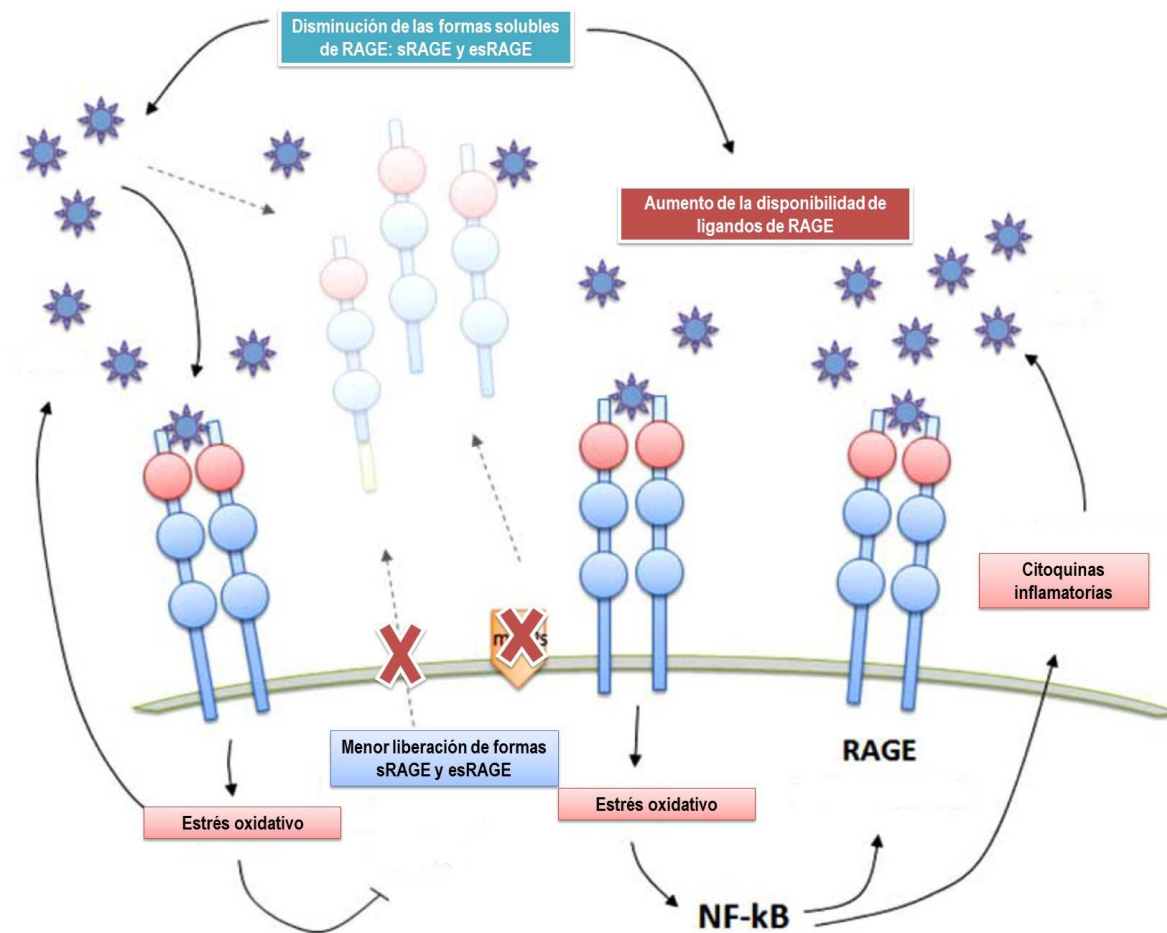


Figura 5. Diagrama que representa RAGE de membrana y RAGE soluble mostrando la unión a diferentes ligandos y, de forma general, las vías de señalización intracelular influidas por la acción antagonista de la forma soluble⁸⁶.

4 RAGE y sRAGE en la población pediátrica

El conocimiento sobre el receptor de productos avanzados de glicosilación en la población pediátrica es escaso. Es por esto que para la realización de este trabajo de tesis ha sido necesario primero conocer y describir los valores de RAGE de membrana y sRAGE en una población sana, para posteriormente analizar sus valores en el paciente con NAC. En los dos casos el eje RAGE se ha examinado desde tres perspectivas: citometría de flujo, forma soluble en plasma y relación de ambos mediante un ratio.

El estudio de la forma de membrana de RAGE mediante citometría de flujo apenas ha sido explorado^{40, 87} siendo las publicaciones de *Arce-Mendoza et al*⁴⁰ y *Dettoraki et al*⁸⁷ los únicos ejemplos de trabajos que *in vivo* determinan RAGE mediante citometría de flujo de células de sangre periférica.

Algo semejante ocurre con la distribución de sRAGE en niños, que tampoco ha sido establecida con certeza^{33, 87}, y el “ratio sRAGE/IFM de RAGE”, parámetro novedoso sobre el perfil de RAGE incluido en este trabajo. En relación al citado ratio, y como único antecedente de interés destaca el trabajo de *Kajikawa et al*, donde se relaciona de forma semejante el valor de sRAGE con el de las moléculas partícipes de la activación de este eje⁸⁸.

4.1 Intensidad de fluorescencia de RAGE

La detección de la intensidad de fluorescencia media (IFM) por citometría de flujo se basa en la cuantificación de la luz emitida por una molécula fluorescente (fluoróforo) tras ser excitada por una luz de mayor intensidad y una longitud de onda más baja. La molécula excitada emite luz, normalmente con menor energía y a una longitud de onda mayor que la luz de excitación, y fluoresce durante un microsegundo tras la excitación. Dicha luz emitida es filtrada, recogida y medida por un detector que la cuantifica en unidades relativas de fluorescencia y permite obtener la citada IFM⁸⁹. El estudio de RAGE en la superficie celular mediante un

anticuerpo anclado a un fluoróforo permite así determinar tanto la presencia de esta molécula (el fluoróforo emite luz) como la intensidad con la que esta emisión se produce (a mayor intensidad de fluorescencia, mayor presencia de RAGE).

La intensidad de fluorescencia media (IFM) de RAGE en linfocitos y monocitos de sangre periférica no ha sido estudiada hasta la realización de este trabajo. Sí se ha estudiado mediante otras técnicas en contextos no infecciosos, que si bien no permiten anticipar su comportamiento sí ofrecen datos sobre los valores esperables al menos en contexto basal.

En la población pediátrica, la IFM de RAGE ha sido fundamentalmente explorada en pacientes con *diabetes mellitus* en los que el eje RAGE se ve influido por un persistente estrés oxidativo y glicosilación no enzimática de proteínas circulantes. Así en el trabajo de *Athina Dettoraki et al*, realizado en población pediátrica sana y con diabetes mellitus tipo 1, se estudia la expresión de RAGE en superficie celular mediante el de Western-Blot y densitometría, objetivando cómo la expresión de RAGE en membrana es superior en los pacientes sanos frente a los diabéticos. En el caso de la forma soluble se observa lo contrario. Los valores de sRAGE fueron mayores en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 que en los controles (1430 ± 759 vs 1158 ± 595 pg/ml, $p = 0.047$). En este trabajo se contextualiza el papel del eje RAGE con los diferentes parámetros bioquímicos que informan sobre el estado metabólico del paciente. Se concluye que los valores más elevados sRAGE en el enfermo se podrían relacionar con el papel protector de esta molécula frente al daño celular consecuencia del perfil oxidativo predominante⁸⁷.

Por otro lado, y también en pacientes con diabetes pero de edad adulta, *Mendoza-Arce y colaboradores* estudian RAGE en membrana de células mononucleares en un modelo de infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello se cultivan y enfrentan células mononucleares de sangre periférica a un derivado de este agente infeccioso para realizar

posteriormente una determinación mediante citometría de flujo de los valores de IFM para RAGE. En los pacientes con diabetes mellitus, de forma opuesta a lo visto en niños, la IFM de RAGE basal fue superior a los controles. A su vez los pacientes con DM y tuberculosis mostraron un descenso con respecto al paciente con DM aislada. Con este trabajo se propone la posible disminución de la expresión de RAGE de membrana como una respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* sin ofrecerse datos en relación a los valores de sRAGE, estado metabólico o su posible correlación con la expresión de RAGE en membrana⁴⁰. Finalmente, también en adultos pero con diabetes tipo II, *Tam XH y colaboradores* describen una correlación negativa entre los valores de sRAGE y la forma de membrana en monocitos de sangre periférica medida mediante Western-blot ($r=-0.34$, $P=0.01$) Este trabajo, a pesar de ser este su único hallazgo destacable, resulta de especial interés en cuanto al objeto de nuestro trabajo. Parece establecer un antecedente sobre a la existencia de correlación entre los valores de RAGE de membrana y sRAGE⁹⁰.

4.2 sRAGE

El valor de sRAGE en niños sanos es prácticamente desconocido^{33, 91}. En el contexto de afectación respiratoria, *Yerkovich y colaboradores* estudiaron los valores de sRAGE en plasma y lavado broncoalveolar de niños que requirieron de este procedimiento como parte del manejo clínico de la tos crónica. En este trabajo se objetiva una mayor concentración de sRAGE en lavado broncoalveolar que en plasma (Figura 6), que muestra a su vez una correlación negativa con la edad sin que esto se repita con la forma plasmática. Este hallazgo no permite ofrecer conclusiones o datos de interés en relación a la posible influencia, o relación, de sRAGE con el proceso respiratorio que condicionó la fibrobroncoscopia³³.

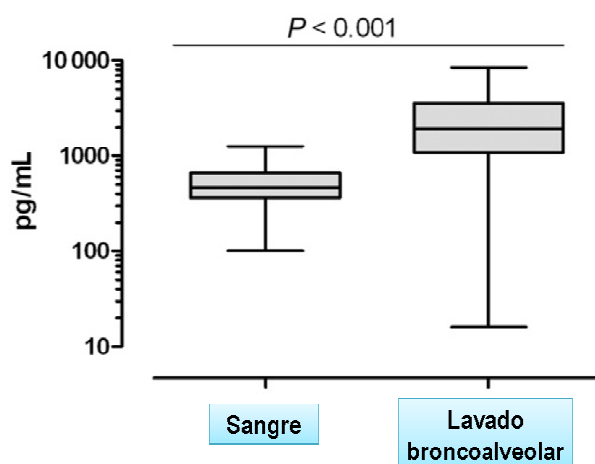


Figura 6. Valores de sRAGE en sangre y lavado broncoalveolar de 62 niños (mediana de edad 20,1 meses, rango intercuartílico de 11,8-41,0) donde se observan de forma significativa un mayor valor en lavado broncoalveolar³³.

También en niños con enfermedad pulmonar *El-Seyfi* y colaboradores describen el valor de sRAGE en plasma en un grupo de 60 niños con asma. Se objetiva que el valor de sRAGE en asmáticos es menor (899.1 +/- 399.8 pg/mL) que en niños sanos (1406.7 +/- 474.3 pg/mL, $p = 0.000$) siendo más bajo el valor de sRAGE en pacientes con mayor afectación respiratoria. Se añade además el estudio de la citología del esputo, así niños con más de un 2% de eosinófilos y más de un 40% de neutrófilos en este mostraron valores de sRAGE más bajos (710 +/- 258 pg/mL) que los que presentaban menos del 40% de neutrófilos (1064 +/- 431 pg/mL, $p = 0.000$). Este trabajo demuestra una correlación positiva entre los valores de sRAGE y el FEV 1% ($r = 0.41$, $p < 0.01$) y negativa con el valor de eosinófilos en sangre periférica e IgE ($r = -0.49$ y -0.39 , respectivamente, $p < 0.01$). Dado que los valores descienden con la gravedad clínica⁹¹, los autores lo relacionan con una menor reserva antiinflamatoria vía sRAGE en estos pacientes.

De forma continuista con los trabajos descritos, nuestro grupo, como parte complementaria del trabajo realizado para esta tesis, realizó un estudio piloto en pacientes con bronquiolitis aguda grave en el que se estudiaron los valores plasmáticos de la forma soluble de

sRAGE en este contexto y su posible correlación con la situación respiratoria del paciente y el tratamiento recibido (ver más adelante y anexo 2)⁹².

5 Eje RAGE: justificación sobre su posible papel en la NAC

Actualmente los trabajos relacionados con el eje RAGE se han realizado de forma mayoritaria en población adulta, tanto con intención de describir sus valores en población sana como para conocer su variación en población con enfermedad o inflamación aguda o crónica⁹³.
⁹⁴. El número de trabajos que estudian el papel de RAGE y, sobre todo, sRAGE en la evolución clínica ante diferentes procesos infecciosos es aún pequeño, y existe un incremento del interés sobre el mismo con foco no sólo en procesos pulmonares, sino en otros de naturaleza sistémica⁶.
39, 46, 68, 76, 79, 95-101.

Considerando procesos de inflamación de causa infecciosa y afectación sistémica la sepsis resulta un ejemplo fundamental. Este es un cuya morbilidad, mortalidad y prevalencia, puede verse beneficiado del estudio de nuevos biomarcadores. En este contexto, y considerando la posible información que sobre el daño pulmonar sRAGE pudiera ofrecer, el grupo de *Jabaudon y colaboradores* estudian 18 pacientes con sepsis y daño pulmonar, comparándolos con 15 pacientes con distress respiratorio aislado y 16 pacientes con sepsis sin daño pulmonar. Como controles utilizan 15 pacientes con ventilación mecánica sin daño pulmonar. Tras realizar determinaciones al ingreso, al tercer, al quinto y al vigesimoctavo día de ingreso observan que los valores de sRAGE son siempre más elevados en aquellos pacientes con daño pulmonar ya sea este aislado o asociado a sepsis (figura 7)⁸³. Con intención de confirmar este hallazgo, pero sin éxito, *Hamasaki MY y colaboradores* estudiaron los valores de sRAGE en diferentes estadios de la sepsis, observando que estos si bien estos son mayores cuanto más grave es el cuadro no hay relación con el grado de afectación pulmonar. El grupo de *Hamasaki MY* estudia también la

correlación de sRAGE con otros biomarcadores clásicos, comprobando que esta solo aparece para para sRAGE e interferón gamma en los pacientes con shock séptico⁹⁸.

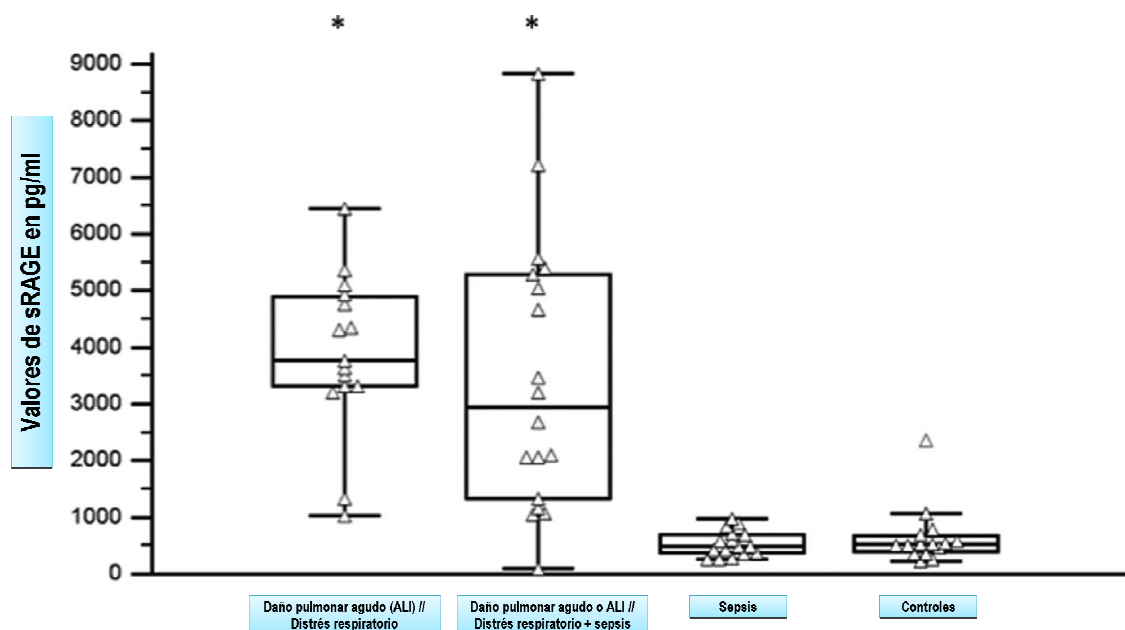


Figura 7. Los valores más elevados de sRAGE pertenecen al grupo con daño pulmonar (ALI) o distrés respiratorio aislado o vinculado a sepsis siendo significativa esta diferencia al comparar con controles (indicado con *)⁸³.

Continuando con el análisis de la sepsis y sRAGE, el grupo de *Christian Bopp* estudian 29 pacientes adultos con sepsis y 8 adultos sanos. Objetivan que los valores en enfermos son mayores que en controles sanos (1764 ± 138 versus 1026 ± 177 pg/mL, $p < 0.05$) siendo además mayor en los pacientes que fallecen (2302 ± 189 versus 1326 ± 112 pg/mL, $p < 0.001$)⁹⁵. En este trabajo sRAGE se presenta no tanto como un marcador de daño pulmonar, sino como un dato de interés acerca de la evolución global del enfermo. Este nuevo aspecto, la posible utilidad de sRAGE como marcador pronóstico, no ha sido completamente confirmado debido a la obtención de resultados dispares. Otorgándole validez para este objetivo se encuentra el grupo de *Brodzka y colaboradores*, que estudian sRAGE junto con otros marcadores habituales de inflamación en el contexto de sepsis. Para ello reclutan 54 pacientes y objetivan que los pacientes que fallecen presentan un valor de sRAGE en las primeras 24 horas más elevado que los supervivientes. A

su vez se describe la correlación con los biomarcadores habituales de sepsis y escalas de valoración de gravedad como el APACHE II¹⁰². Con este mismo enfoque el grupo de *Matsumoto y colaboradores* estudia el valor de sRAGE en 24 pacientes con sepsis comparando con 12 controles sanos, y confirma la elevación de los valores de sRAGE en los pacientes con sepsis describiendo una correlación positiva de sRAGE con los marcadores de gravedad APACHE II y SOFA además de un escore de coagulación intravascular diseminada¹⁰¹. Sin embargo, tal y como se ha indicado este hallazgo no se ha visto confirmado en todos los casos, sirviendo como ejemplo el trabajo de *Cheng y colaboradores*, que tras estudiar 70 pacientes con sepsis y 25 controles, a pesar de observar un aumento de sRAGE en los enfermos con respecto a los controles no encuentran correlación con la mortalidad a los 28 días¹⁰³.

Poniendo el acento en el daño pulmonar, existen de nuevo escasos precedentes en la literatura científica en los que se describan y analicen los niveles de sRAGE en caso de afectación respiratoria pura¹⁰⁴. En el contexto de infección se deben destacar dos trabajos fundamentales. Desde el punto de vista experimental *Van Zoelen y colaboradores* estudian el comportamiento de RAGE en un modelo murino con neumonía producida por virus influenza (ratón sin modificación genética versus ratón knock-out para RAGE). Se estudian los valores de sRAGE en territorio alveolar junto con marcaje de RAGE en endotelio pulmonar mediante inmunohistoquímica. Se describe un incremento en la expresión de RAGE en pulmón a consecuencia de la infección viral, un incremento de la expresión de sRAGE en el territorio alveolar y una posible influencia de RAGE en el perfil activatorio ante la infección por parte de los ratones al comparar aquellos sin modificación genética con los knock-out para RAGE¹⁰⁵. A su vez, y ya desde un punto de vista clínico, el grupo de *Narvaez-Rivera y colaboradores* estudia de forma específica la intensidad de fluorescencia media en leucocitos de pacientes con sepsis por neumonía. Este grupo observa, sin presentar significación estadística, unos valores de sRAGE

mayores en los pacientes no supervivientes o con distrés respiratorio agudo sin que la IFM de RAGE observada fuera diferente a los controles¹⁰⁶.

Finalmente, nuestro grupo realizó un estudio preliminar sobre los valores de sRAGE en pacientes con bronquiolitis aguda ingresados en la unidad de cuidados intensivos (ver anexo 2). Se observó una elevación de los valores de forma soluble en este contexto en comparación con los controles (Figura 8) mostrando además correlación negativa con la escala de Wood-Downes modificada por Ferres al ingreso. El valor de sRAGE resultó mayor en niños con un test positivo para virus respiratorio sincitial (VRS, $n = 32$, $1,270 \pm 552$ pg/mL vs no VRS, $n = 5$, 863 ± 187 pg/mL; $p = 0.12$) y presentó un pequeño incremento sin significación estadística a las 24 horas de ingreso en los 22 pacientes analizados a este respecto (Figura 9)⁹².

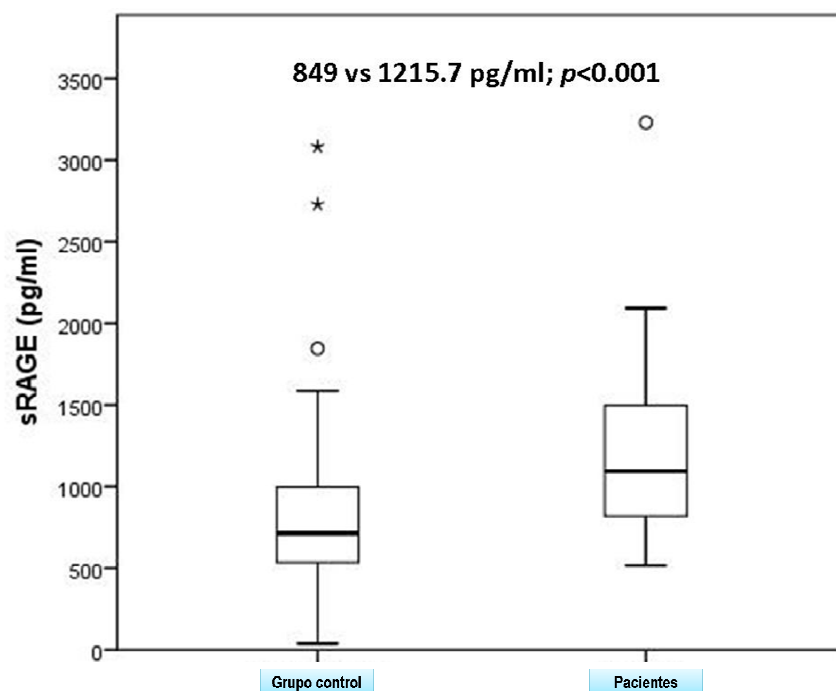


Figura 8. Valores de sRAGE en pacientes con bronquiolitis aguda grave versus controles sanos, se observan diferencias significativas. Datos no publicados.

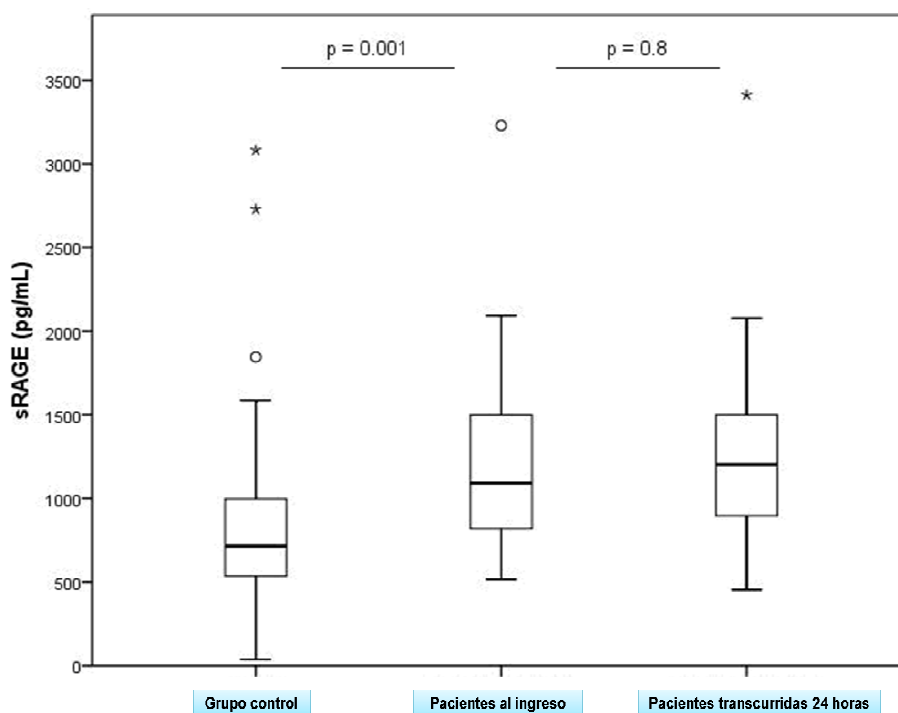


Figura 9. La mediana de sRAGE (pg/mL) al ingreso fue de 1215.7 ± 535.1 siendo a las 24 horas de 1275.9 ± 635.4 ($n=22$, sin diferencias significativas). Datos no publicados.

6 Eje RAGE y NAC, consideraciones para este trabajo

Una vez descritas las diferentes variables y publicaciones relacionadas con el eje RAGE que justifican el interés de este trabajo, se describen a continuación aquellas variables que incluidas en la recogida de datos también podrían aportar nuevos datos acerca del comportamiento de RAGE en la NAC.

6.1 Antecedentes de enfermedad

En la población adulta el estudio de RAGE se inicia en pacientes en los que debido a una situación de inflamación crónica se consideró de interés describir su papel⁹⁴. En la población pediátrica el estudio del eje RAGE ha suscitado escaso interés. Esto resulta comprensible dado que la existencia de patología inflamatoria crónica en el niño es poco prevalente y, del mismo modo, resultan infrecuentes aquellas enfermedades que por condicionar estrés oxidativo persistente pudieran favorecer la activación del eje RAGE^{35, 36, 69, 86, 107}.

Actualmente el eje RAGE ha sido explorado en niños con asma, enfermedades reumatológicas, y la diabetes. En todos ellos, de forma global, los resultados obtenidos son dispares e impiden definir un patrón de comportamiento de esta molécula en la infancia y anticipar qué ocurrirá en el contexto de la NAC.

En niños con afectación respiratoria crónica es conocido, gracias al trabajo de *El-Seify MY y colaboradores*, que el valor de sRAGE parece verse modificado⁹¹. Al mismo tiempo, y al considerar otros tipos de inflamación no respiratoria, como sería la articular, se describen valores de sRAGE elevados o disminuidos sin establecerse una conclusión certera. Autores como *Chen YS y colaboradores* no objetivan diferencias entre controles y pacientes con artritis reumatoide¹⁰⁸ al tiempo que otros, como el grupo de *Myles A*, observan que el valor de sRAGE resulta menor en enfermos que en controles sanos (515 rango 64-1887 pg/mL versus 1542 rango 627-3159 pg/mL; $p < 0.0001$)¹⁰⁹.

En el contexto de la diabetes mellitus se han comunicado también resultados dispares sin ofrecerse interpretaciones concluyentes. El grupo de *Giannini C* observa un valor de sRAGE más bajo en pacientes diabéticos que en controles (1174 ± 300 pg/mL vs 1540 ± 373 pg/mL, $p = 0,001$)¹¹⁰ al tiempo que, con resultados contrarios, *Dettoraki A* describe un valor más elevado de sRAGE en sus pacientes (74 vs 43, 1430 ± 759 vs 1158 ± 595 pg/ml, $p = 0.047$)⁸⁷. Finalmente, y como contrapunto a estos trabajos, el grupo de *Salonen KM et al*, realiza un estudio masivo en el que incluyen 2115 niños menores de 15 años con diabetes tipo 1 y 316 controles, en el que no encuentran diferencias entre sanos y pacientes (1,171 vs. 1,153 pg/mL, $P = 0.48$, Figura 10)¹¹¹.

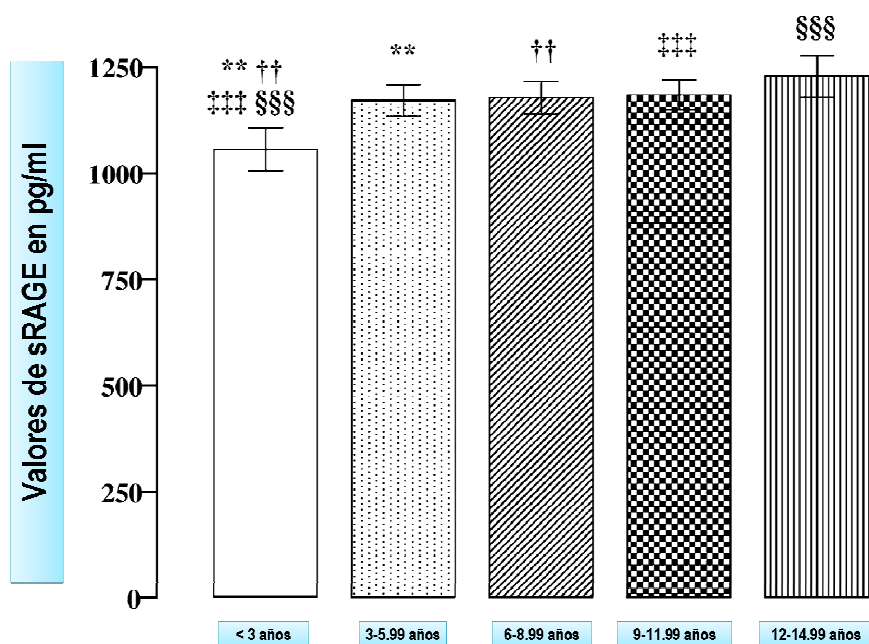


Figura 10. Pacientes con diabetes, los menores de 3 años ($n = 286$) presentan los valores más bajos de sRAGE (se muestran en barras con un CI del 95%) $**P = 0.003$ vs. Niños de 3–5.99 años ($n = 442$). $††P = 0.002$ vs. niños de 6–8.99 años ($n = 473$). $†††P, 0.001$ vs. niños de 9–11.99 años ($n = 534$). $†††P, 0.001$ vs. niños de 12–14.99 años ($n = 380$)¹¹¹.

Considerando lo ya comentado, y dada la ausencia de datos certeros acerca de la posible influencia de los antecedentes del paciente sobre los valores de RAGE y sRAGE obtenidos, se tomaron dos medidas: 1) Por un lado con intención de evitar la posible influencia sobre el valor “normal” de RAGE y sRAGE, no se incluyeron entre los controles individuos con enfermedades que añadan estrés oxidativo o presenten base inflamatoria 2) Entre los casos, y puesto que en este grupo los antecedentes de enfermedad no eran un criterio de exclusión, se realizó una categorización posterior.

6.2 Células blancas y plaquetas

La presencia e influencia del eje RAGE sobre el valor y distribución de los leucocitos en sangre periférica no ha sido establecida^{112, 113}. Tanto el eje RAGE como las células blancas participan en procesos inflamatorios, siendo así razonable esperar una posible relación en su actividad en ese contexto.

Actualmente no se ha estudiado ni se ha descrito la presencia de RAGE en la membrana de leucocitos de sangre periférica¹¹². Sí ha sido descrita en cambio la posible influencia de la forma soluble de RAGE, sRAGE, en el reclutamiento de estas células^{59, 112}. Como punto de partida para establecer la posible relación entre el eje RAGE y la inflamación mediada por células blancas *Liliensiek y colaboradores*, describieron el papel de RAGE en la sepsis. Mediante un modelo animal observan la presencia de esta molécula en diversos tejidos como cerebro, pulmón, hígado y riñón. Posteriormente, y mediante el uso de sRAGE en una modelo de reacción de hipersensibilidad retardada, objetivan cómo la instilación peritoneal de esta isoforma disminuye la inflamación y modifica el reclutamiento leucocitario⁹³. Más adelante *Frommhold y colaboradores* aportan información acerca de la influencia de sRAGE sobre los leucocitos. En este caso se estudia en el contexto de una inflamación condicionada por traumatismo, observando cómo RAGE participa en el reclutamiento y adhesión de células blancas solapando su función a la realizada por la molécula de adhesión intercelular o ICAM-1. La isoforma sRAGE parece iniciar el reclutamiento de neutrófilos en el tejido lesionado lo que podría explicar su papel en la inflamación del trauma y estar vinculado a su presencia en el tejido diana¹¹⁴. Este hecho es también demostrado por *Wang y colaboradores* que observan como sRAGE participa en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el tejido pulmonar instilado con lipolisacarido. A su vez sRAGE parece facilitar la diferenciación y supervivencia de los monocitos, jugando también un papel de interés en la maduración de los macrófagos en un contexto inflamatorio¹¹⁵.

Estas observaciones, constituyen el motivo de estudios clínicos como los realizados por *Buschmann y Sukkar*. El grupo de *Buschmann y colaboradores* estudia el papel en la adhesión de leucocitos por parte de RAGE en las células de cordón umbilical de neonatos nacidos con menos de 30 semanas, entre la semana 30-35 y tras más de 35 semanas de gestación. Concluyen que RAGE es crucial en la adhesión de las células blancas y confirman que su papel es semejante al atribuido a ICAM-1¹¹². Por su parte *Sukkar y colaboradores* obtienen valores de

sRAGE más bajos en los pacientes con neutrofilia y enfermedad pulmonar (asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica), algo que les lleva a concluir que sRAGE disminuye a consecuencia de su captura por las células blancas circulantes y el tejido inflamado¹¹⁶. Por todo esto parece de gran interés explorar la posible relación del eje RAGE y las células blancas circulantes en la NAC, con intención de aportar información novedosa acerca del perfil inflamatorio del cuadro.

En cuanto a las plaquetas, si bien no participan en la defensa frente a la infección acontecida en una NAC, se ven modificadas en número y actividad por la inflamación subyacente ante la acción de diversas interleucinas^{97, 117}. Puesto que el eje RAGE parece tener influencia sobre el perfil activatorio de las plaquetas resulta de interés conocer si esto se puede observar en los pacientes incluidos (Figura 11)¹¹⁷. Existen escasas publicaciones que estudien esto, resultando de interés a este respecto el trabajo de *Mauri et al*, realizado en población adulta con distrés respiratorio, en el que se observa que los valores de sRAGE muestran una correlación negativa con el número de plaquetas circulantes sin aportar conclusiones en cuanto a las consecuencias de este hecho¹¹⁸.

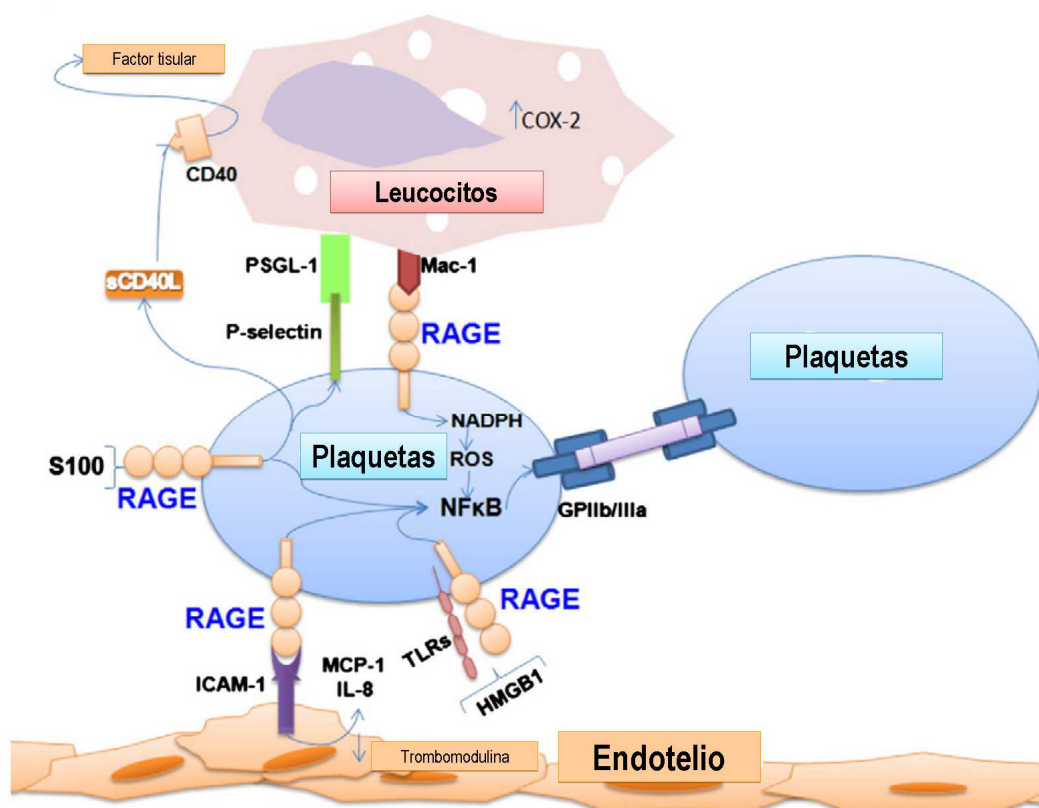


Figura 11. Activación de plaquetas dependiente de sRAGE. Se produce, en contexto inflamatorio, la activación plaquetaria vía NFκB gracias a la unión inespecífica con ICAM-1, HMGB1 y S-100. sRAGE también participa en la unión con leucocitos mediante Mac-1⁹⁷.

6.3 Reactantes de fase aguda

La proteína C reactiva o PCR es un reactante de fase aguda cuya modificación o variaciones en contexto infeccioso ha sido claramente descrita¹¹⁹. Parece razonable esperar que la proteína C reactiva, de algún modo expresión cuantitativa de la inflamación subyacente, pudiera relacionarse con el eje RAGE.

Actualmente no se dispone de datos o publicaciones en la literatura que permitan anticipar la asociación entre los valores de RAGE de membrana y la PCR. En cuanto a sRAGE se refiere hay evidencia dispar sobre la relación entre ambos parámetros. En el año 2013 Ge y colaboradores¹²⁰, estudiaron los valores de sRAGE en pacientes con alteración cognitiva. Este grupo observó que se encontraban valores elevados y sin correlación de sRAGE y PCR. El mismo año se describe en el trabajo realizado en pacientes sépticos de Brodsky y colaboradores

una correlación positiva entre los valores de sRAGE y PCR el tercer día de ingreso en UCIP ($r=-0.496$, $p=0.016$)¹⁰². Este hallazgo resulta contrario a lo visto por *Ge y colaboradores*¹²⁰ y no se confirma en el trabajo de 2014 realizado por *Bobek D* en pacientes reumatológicos¹²¹. Estos autores estudian el posible papel de sRAGE y HMGB1 en la inflamación de pacientes con artritis idiopática juvenil y lupus eritematoso sistémico. Observan que los valores de sRAGE son menores que en los controles y muestran una correlación negativa con los valores de PCR ($r=-0.283$; $p = 0.010$). Como se observa, no hay una evidencia concluyente y describir la posible relación entre sRAGE, IFM de RAGE y la PCR en la neumonía adquirida en la comunidad aportará nuevos datos sobre este hecho.

6.4 Pruebas de imagen y evolución clínica

La afectación pulmonar evaluada mediante pruebas de imagen podría mostrar relación con los valores del eje RAGE en los casos de NAC. No existen publicaciones sobre la forma de membrana pero se pueden destacar dos trabajos publicados en 2013 en el que en contexto de enfermedad pulmonar obstructiva crónica determinan y contextualizan los valores de sRAGE en pacientes con daño pulmonar visto mediante tomografía computerizada.

Estos trabajos, realizados por *Cheng*¹²² y *Coxson*¹²³, concluyen que los valores de sRAGE son más bajos en aquellos pacientes con mayor afectación radiológica en forma de enfisema. Ambos grupos atribuyen a sRAGE un posible efecto antiinflamatorio, disminuyendo sus valores como consecuencia de la inflamación pulmonar mantenida en estos pacientes. No se especifica la posible influencia de la disminución de parénquima pulmonar sobre el valor de sRAGE. Así resulta de interés conocer cómo se comporta este eje en base al daño macroscópico visto por radiografía en los pacientes con neumonía. Relacionar la extensión del mismo, según el informe del radiólogo, con los marcadores motivo de estudio resulta de interés.

En cuanto a la evolución clínica se refiere, el eje RAGE ha sido estudiada a este respecto en cuadros no exclusivamente vinculados al territorio pulmonar, como la sepsis y shock séptico^{7, 32, 83, 98, 106}. Parece interesante estudiar el posible papel que el eje RAGE, y sRAGE en particular, pudiera tener como marcador de evolución y complicaciones. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, hasta la redacción de este texto se han publicado diversos trabajos con resultados dispares acerca del papel del eje RAGE como biomarcador. De forma conjunta estos trabajos, si bien no establecen de forma clara la posible influencia de los valores de sRAGE sobre la evolución clínica, justifican su descripción y análisis con intención de aportar nuevos datos sobre su utilidad como herramienta clínica.

IV. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

La evolución y el estado inflamatorio de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que requiere ingreso hospitalario podría estar influenciada por los niveles de RAGE en superficie celular de los monocitos, los valores de sRAGE en plasma de sangre periférica y la relación entre ambas isoformas. Podría existir una correlación íntima entre la regulación de los niveles de estas proteínas y la evolución de la NAC.

2. Objetivos

2.1 Objetivos primarios:

2.1.1 Describir los niveles de sRAGE en el plasma sanguíneo así como la expresión de RAGE en linfocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en controles sanos y pacientes con NAC.

2.1.2 Conocer si los niveles de sRAGE en el plasma sanguíneo así como la expresión de RAGE en linfocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son diferentes entre controles sanos y pacientes con NAC.

2.1.3 Determinar si las diferencias entre los valores de sRAGE y expresión de RAGE de membrana en sanos y enfermos constituyen un marcador de gravedad o evolución en la NAC.

2.1.4 Determinar y describir las diferencias, en controles sanos y pacientes con NAC, de la suma de intensidad de fluorescencia media (IFM) de monocitos y linfocitos, el ratio sRAGE/IFM en monocitos, el ratio sRAGE/IFM en linfocitos y el ratio sRAGE/IFM de la suma.

2.2 Objetivos secundarios:

2.2.1 Estudiar si los niveles de sRAGE en el plasma sanguíneo y la expresión de RAGE en PBMCs de los pacientes con NAC tienen relación con los antecedentes del paciente, la situación clínico-analítica al ingreso y el diagnóstico de presunción.

2.2.2 Estudiar si los niveles de sRAGE en el plasma sanguíneo y la expresión de RAGE en PBMCs de los pacientes con NAC tienen relación con la respuesta al tratamiento pautado y la evolución posterior o complicaciones del paciente.

V. Material y métodos

1. Diseño y sujetos de estudio

Estudio, prospectivo y observacional, aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones Clínicas del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Este trabajo se realiza desde noviembre 2011 a mayo de 2014. El reclutamiento de los pacientes se lleva a cabo durante un período de dos años con el objetivo de minimizar la influencia de variables que pudieran estar relacionadas con los cambios epidemiológicos típicos de cada estación. A continuación se describen mediante un cronograma las diversas fases comprendidas en el trabajo:

	2011	2012	2013	2014
Recogida y procesamiento de muestras (controles)				
Recogida y procesamiento de muestras (controles y casos)				
Análisis de los patrones obtenidos				
Análisis y correlación con datos clínicos				

Figura 12. Cronograma de trabajo realizado. Durante el año 2011 se inicia el reclutamiento de controles, además se realiza la adecuación de los experimentos y las técnicas de laboratorio necesarias para el procesamiento de las muestras. Posteriormente en el año 2012 se inicia la inclusión de enfermos que se mantiene hasta mayo de 2014. También desde el año 2012 se comienza el estudio de los patrones obtenidos que se analizan y correlacionan con los datos en los pacientes.

Los criterios de inclusión para el grupo control y el grupo de casos fueron los siguientes:

- Grupo control: se reclutaron donantes voluntarios sanos que acudieron para la realización de hemograma al servicio de extracciones hematológicas del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Todos ellos cumplieron el mismo rango de edad y características que el de los pacientes a incluir en nuestro estudio (0-18 años, ver más adelante).
 - Se excluyeron del grupo control individuos en tratamiento con corticoides o fármacos inmunosupresores, con enfermedades inflamatorias crónicas o procesos tumorales, que sean portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), Hepatitis B o C, que mostraran signos de afectación hepática (niveles de aminotransferasas > 100 IU/L, tiempo de protrombina < 60%, nivel total de bilirrubina > 0,6 mg/dl), con datos de insuficiencia renal (nivel de creatinina en plasma > 2 mg/dl), pacientes con alteración del sistema inmune de cualquier índole (derivado de enfermedad o tratamiento médico), pacientes con patología respiratoria de base, pacientes diabéticos de cualquier tipo y pacientes que no acepten participar en el estudio.
- Grupo de casos: pacientes de cualquier sexo en un rango de edad 0 a 18 años que ingresaron por NAC.

Tanto en el grupo control como en el de casos la muestra de sangre periférica se obtuvo tras la firma del consentimiento informado pertinente. Se extrajo 1 ml en niño menores de 2 años de y 2 ml en mayores de esta edad. En aquellos pacientes en los que se añade estudio de líquido pleural, este se realizó también tras la firma de consentimiento informado y sobre 1-2 ml de líquido obtenido de la punción diagnóstico-terapéutica del derrame.

Los casos incluidos en el estudio se clasificaron al ingreso en tres tipos de NAC (típica, atípica o indiferenciada) según sus características clínicas, radiológicas y analíticas (ver tabla 1). Posteriormente se realizó seguimiento clínico hasta el alta.

2 Seguimiento clínico

2.1 Datos recopilados de forma prospectiva en los pacientes ingresados en la unidad de pediatría con diagnóstico de NAC de cualquier tipo: edad en meses, sexo, características de radiografía de tórax al ingreso (infiltrado unilateral, infiltrados bilaterales, consolidación unilateral, consolidación bilateral, derrame pleural uni o bilateral), tipo de neumonía (según criterios indicados en Tabla 1), necesidad de oxigenoterapia al ingreso en pediatría (sí o no), procalcitonina (PCT) al ingreso (en ng/ml), proteína C reactiva (PCR) al ingreso (en mg/dl), días de ingreso en planta hasta alta, días hasta desaparición de fiebre, días de ingreso en planta hasta traslado a UCIP, motivo de ingreso en UCIP (derrame pleural susceptible de drenaje, dificultad respiratoria, sepsis clínica), tipo de antibiótico utilizado al ingreso (ampicilina, amoxicilina-clavulánico, cefotaxima), hemocultivo (realizado, no realizado, positivo, negativo, si positivo se indicará la bacteria).

2.2 Datos recopilados de forma prospectiva en los pacientes ingresados en UCIP (se añadirían a los anteriores): PCT en ng/ml al ingreso en UCIP, PCR en mg/dl al ingreso en UCIP, asistencia respiratoria iniciada (alto flujo, CPAP, ventilación no invasiva, ventilación invasiva), realización de drenaje pleural (sí/no), tipo de líquido pleural (exudado o trasudado según criterios indicados en tabla 5. Ante la presencia de pus se considerará empiema), administración de uroquinasa (sí/no) y número de dosis, complicaciones (shock séptico, fracaso multiorgánico, exitus), necesidad de intervención quirúrgica, días hasta alta de UCIP, días hasta alta de hospital, secuelas.

3. Recogida y procesamiento muestras

Se realiza según el siguiente protocolo:

1. Extracción de sangre periférica al ingreso en urgencias por venopunción; ésta se distribuyó posteriormente en tubos estériles con EDTA que se conservaron siempre un máximo de 24 horas a temperatura ambiente.

2. Se aislaron las PBMCs y el plasma por gradiente de Ficoll-Paque según el protocolo establecido en nuestro laboratorio (Histopaque 1077, Sigma, Aldrich Company Ltd, Dorset, Reino Unido; Figuras 13 y 14).

3. Las PBMCs fueron incubadas y analizadas por citometría de flujo usando FACSCanto de BD Biosciences (figura 14). El plasma obtenido tras el procesamiento de las muestras fue congelado y almacenado a -80°C siempre transcurridas menos de 8 horas tras su obtención.

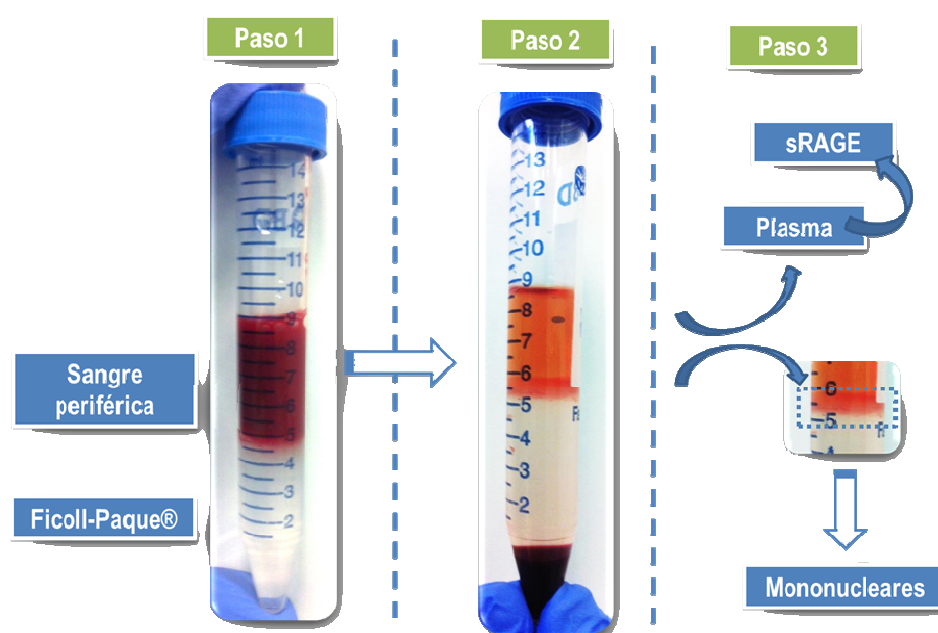


Figura 13. Realización de gradiente de Ficoll-Paque, se obtiene plasma para determinación posterior de sRAGE y PBMCs para citometría de flujo. Paso 1: se deposita la muestra sanguínea sobre 5 ml de solución Ficoll-Paque®. Paso 2: tras centrifugación se obtiene separación por densidad de plasma, monocitos y, en la base del tubo del tubo Falcon, hematíes y polimorfonucleares. Paso 3: se congela a -80°C el plasma obtenido para posterior análisis de sRAGE mediante ELISA. Se obtienen y analizan en citómetro de flujo los mononucleares aislados.

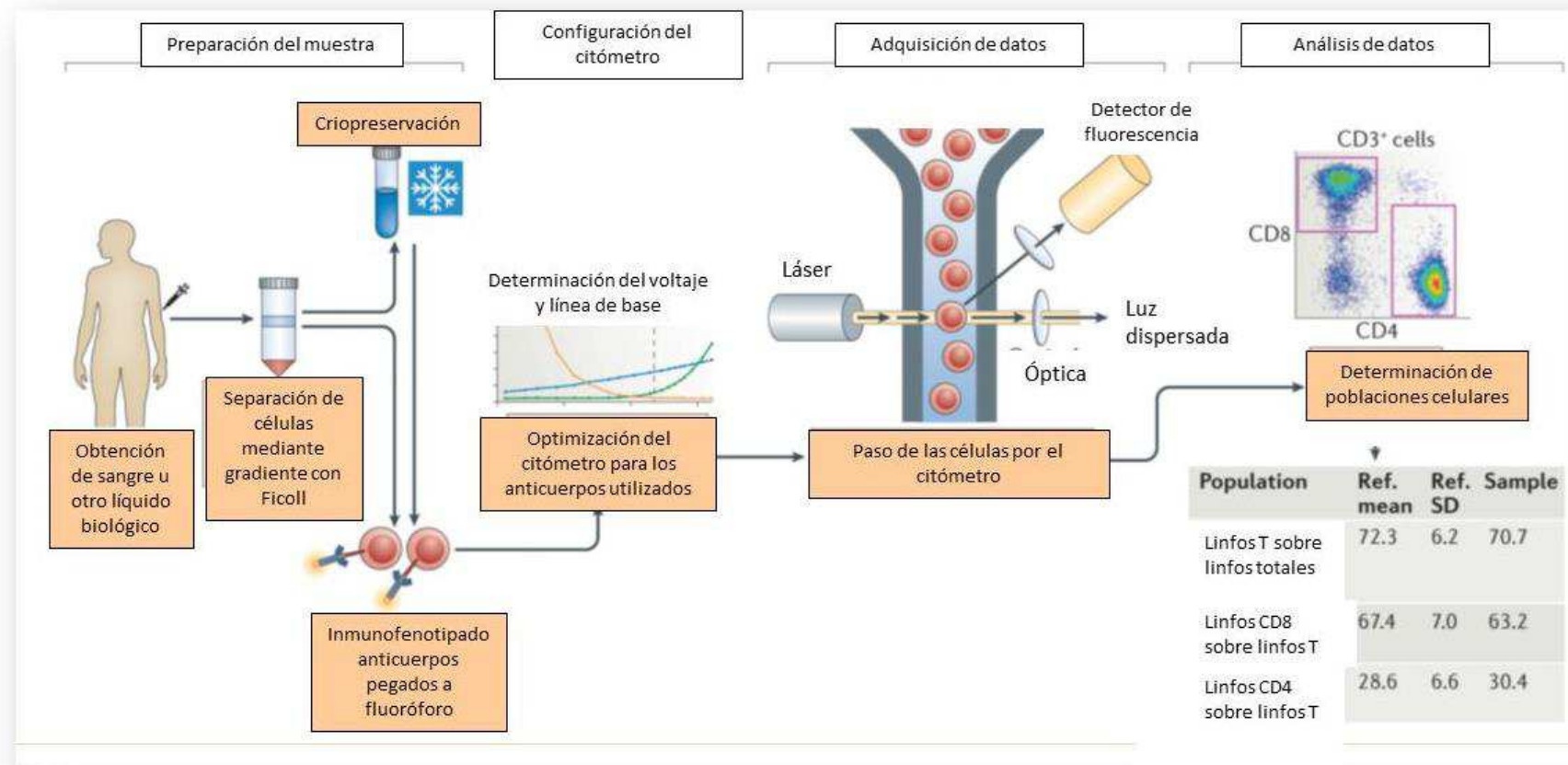


Figura 14. Esquema sobre la obtención, preparación y lectura de muestras celulares en citometría de flujo. En este caso se describe el análisis de sangre periférica tras separación celular mediante gradiente de Ficoll. Finalmente se aíslan los linfocitos CD3+ o T haciendo un análisis posterior de subpoblaciones mediante el marcaje con CD4 (linfocitos T helper) y CD8 (linfocitos T citotóxicos). Traducido de Holden T. Maecker, J. Philip McCoy, y Robert Nussenblatt. *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*¹²⁴.

4. Tipificación de la población aislada de PBMCs

Las muestras de PBMCs se incubaron con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforo para anti-CD45, anti CD-14, anti-RAGE, anti-CD3 y anti-CD19 de Biolegend®. A su vez se empleó marcador de apoptosis celular (7AAD) para conocer el estado de la muestra y seleccionar de forma exclusiva las poblaciones vivas en el momento del análisis. Se realizó finalmente el fenotipado celular mediante citometría de flujo usando FACSCanto de BD Biosciences (Figuras 15 y 16).

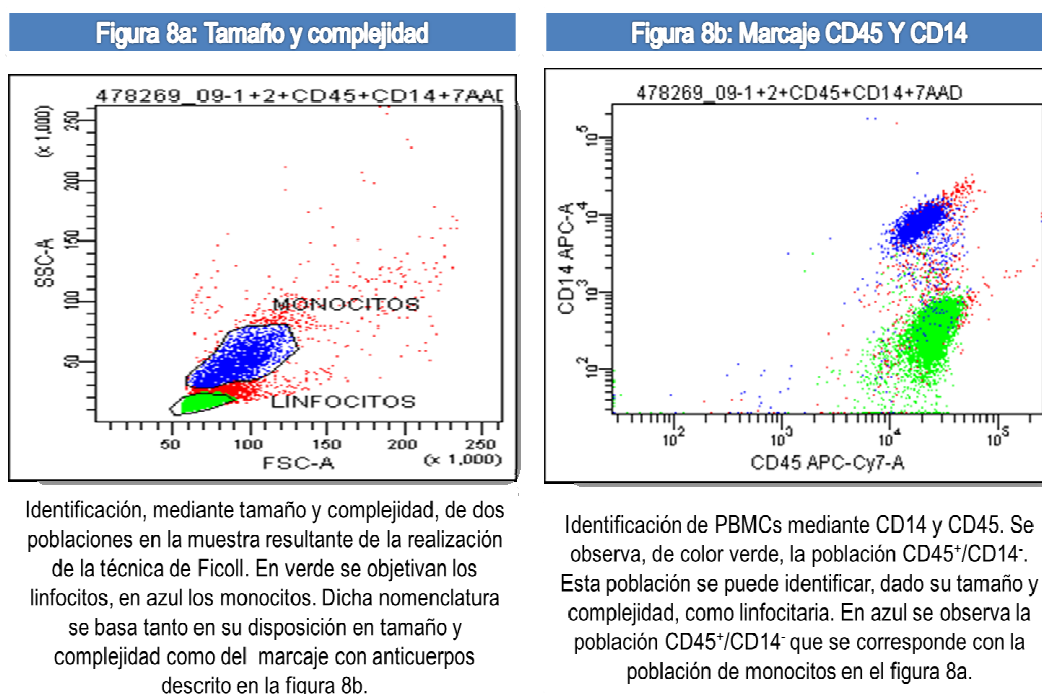
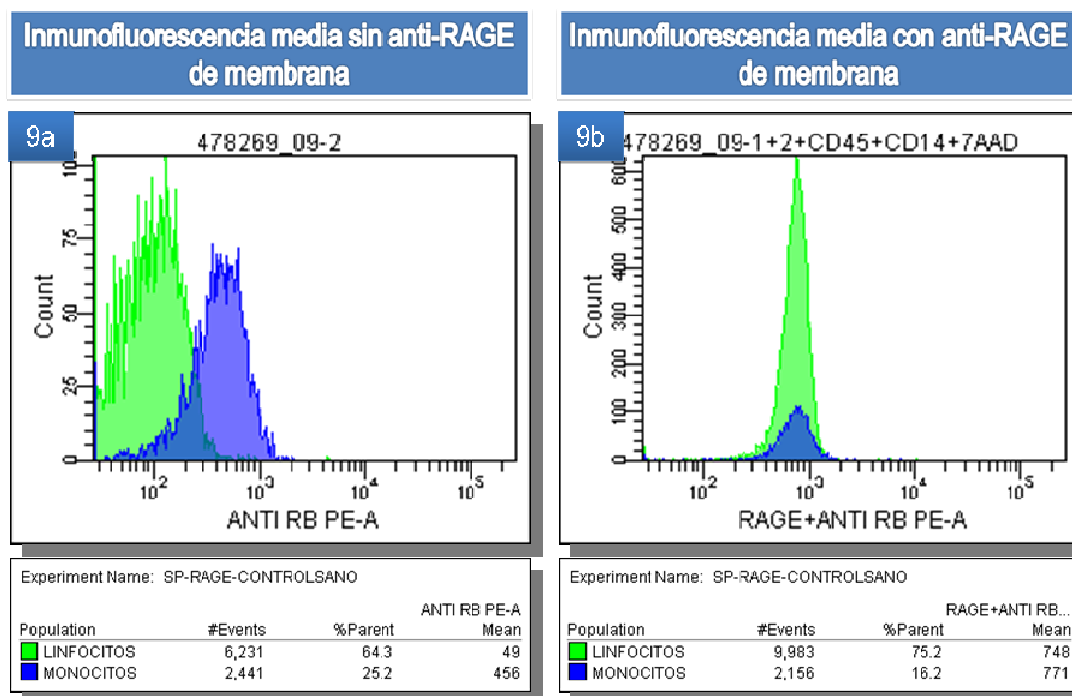


Figura 15. Identificación de células CD45+ y CD14+ en citómetro de flujo.



Para la determinación de la intensidad de fluorescencia (IFM) de RAGE en la membrana de las poblaciones a estudio se realizó el siguiente experimento:

- 1) En dos tubos de citometría diferentes se incluyeron dos alícuotas de la muestra de PBMCs a analizar.
- 2) Alícuota de figura 9a: se incorpora el anticuerpo para RAGE anclado a fluoróforo tras el marcaje con una proteína inespecífica (se obtiene de suero fetal bovino diluido al 10% con PBS, solución estándar y estéril). Tras realizar un lavado y centrifugado para retirar el anticuerpo sobrante se analiza mediante citometría obteniéndose la IFM derivada de la unión inespecífica del anticuerpo con la membrana celular. Se obtiene así el valor de referencia a partir del cual se puede estimar la positividad de RAGE en membrana una vez se realice la unión específica (ejemplo: el valor de IFM para linfocitos es 49 y para monocitos 456).
- 3) Alícuota de figura 9b: se añade un ligando específico para RAGE de membrana y posteriormente se aplica anticuerpo anclado a fluoróforo para este ligando. Se procede al análisis con citómetro tras lavado. Se obtienen nuevos valores de IFM resultantes de la unión específica de RAGE a membrana anticuerpo utilizado (linfocitos 748 y monocitos 771).
- 4) Finalmente se restan los valores obtenidos en ambas alícuotas. Así la IFM de RAGE será la resultante de restar a la IFM derivada de la unión específica aquella producto de unión inespecíficas (IFM de figura 9b – IFM de figura 9a).

Figura 16. Determinación de la inmunofluorescencia media de RAGE en linfocitos y monocitos.

5. Determinación de los niveles de los niveles de sRAGE

Se determinaron los niveles de sRAGE mediante ELISA (R&D systems, Minneapolis, Estados Unidos de América) en las alícuotas de plasma de sangre periférica. El protocolo de ELISA y lectura de las placas se realiza según las instrucciones exactas del fabricante¹²⁵.

6. Análisis estadístico

Se obtienen dos poblaciones de análisis (casos vs controles). La descripción se realiza mediante la media, mediana, desviación típica de las variables cuantitativas así como de la frecuencia absoluta y frecuencia relativa de las variables cualitativas.

Para las variables cuantitativas se desarrollan pruebas de t-Student o ANOVA de un factor en caso de cumplirse la asunción de normalidad y pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para k muestras, en caso contrario. Las variables cualitativas se analizaron mediante test de homogeneidad basadas en la distribución χ^2 cuando los valores esperados lo hagan posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario.

VI. Resultados

1. RAGE y sRAGE en controles sanos

Se reclutaron 43 controles sanos, 13 mujeres y 30 varones. La edad media determinada en meses fue de 95,44 (mínimo 12- máximo 216). La distribución por grupos de edad en años se encuentra en la siguiente figura:

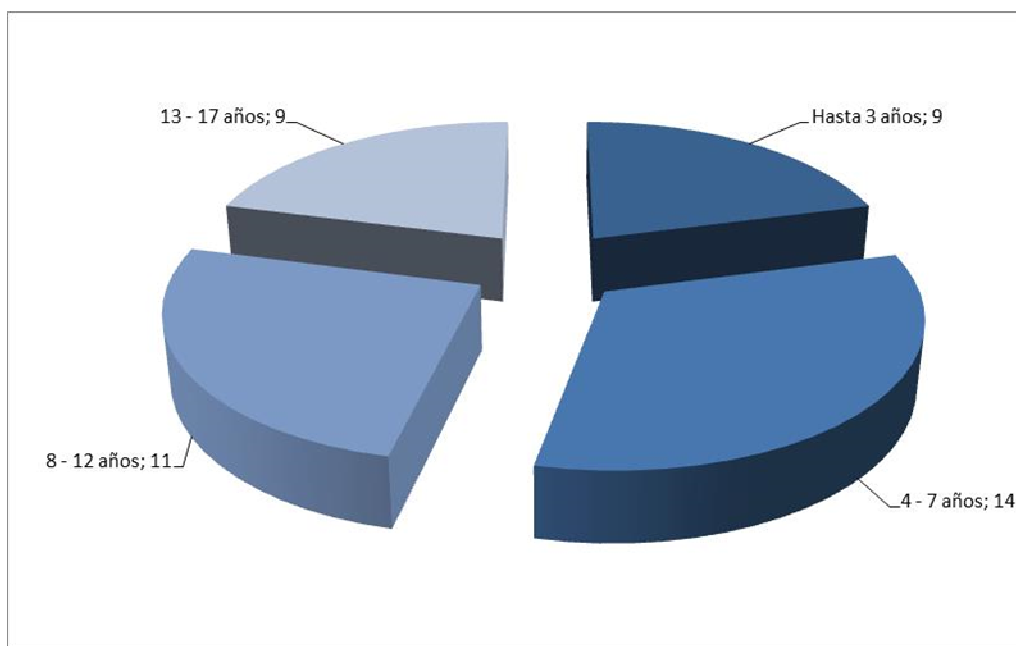


Figura 17. Distribución en años de los controles sanos reclutados para el trabajo.

En las muestras obtenidas de sangre periférica de los controles sanos se realizaron las siguientes determinaciones (Tabla 7):

1. Valor de sRAGE en plasma de sangre periférica mediante técnica de ELISA¹²⁵.
2. Realización de citometría de flujo en PBMCs de sangre periférica para el cálculo de la IFM para RAGE en monocitos y linfocitos. Los valores se ofrecen en unidades arbitrarias de medida.

3. Suma de IFM para RAGE de monocitos y linfocitos: dicho valor se obtuvo de la IFM global para RAGE obtenida de ambos tipos celulares. Se asumió que los valores en plasma de sRAGE se derivaron parcialmente de la liberación mediante una metaloproteasa de la molécula de RAGE anclada a la membrana de estas células.
4. Con intención de ofrecer un valor cuantitativo de la relación entre los valores de sRAGE y su marcaje en membrana sobre PBMCs se obtuvieron los siguientes ratios:
 - a. sRAGE/IFM en monocitos.
 - b. sRAGE/IFM en linfocitos.
 - c. sRAGE/IFM total.

	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
sRAGE pg/ml	849,0	714,2	3082,3	37,7	579,0
IFM en monocitos	1382	1307	2881	755	506
IFM en linfocitos	792	789	1024	578	90
Suma de IFM	2174,23	2125,00	3862,00	1493,00	550,37
Ratio sRAGE/IFM en monocitos	,66	,55	2,35	,03	,43
Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	1,11	,91	4,29	,06	,85
Ratio sRAGE/IFM de la suma	,40	,33	1,52	,02	,27

Tabla 7. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en controles sanos.

Tras la descripción de los diferentes valores obtenidos, y de forma previa a la realización del estudio estadístico de los mismos, se determinó su distribución con intención de conocer si presentan una distribución normal. Para ello se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov asumiendo que la distribución era normal si la significación bilateral del citado test fue superior a 0,05. De este modo todas las variables mostraron distribución normal a excepción del ratio sRAGE/IFM de la suma ($p=0,05$).

1.1 Análisis de los valores de sRAGE e inmunofluorescencia

Se divide este análisis estadístico en tres puntos:

1. Considerando los valores de sRAGE en plasma parcialmente dependientes de la liberación mediante una metaloproteasa de la forma de RAGE anclada a membrana, se correlacionaron los valores de sRAGE e IFM en linfocitos, monocitos y sumatorio de ambas IFM. Así se observó una correlación negativa de sRAGE con el valor de IFM en linfocitos ($R=-0,3$; $p=0,048$ figura 18). Se realizó una regresión lineal univariante donde se objetivó que la disminución en -1,961 unidades arbitrarias de medida de IFM de RAGE en linfocitos se tradujo en el aumento de un pg/ml de la cantidad de sRAGE circulante en sangre periférica.

2. Se estudió la correlación existente entre la IFM en las diferentes PBMCs estudiadas, así se objetivó que existe una correlación positiva entre la IFM de linfocitos y monocitos ($r=0,43$, $p=0,004$). En el estudio mediante regresión lineal univariante un incremento de IFM en monocitos de 0,75 se asoció de un aumento de una unidad arbitraria de medida de inmunofluorescencia de RAGE en linfocitos.

3. Finalmente se estudió la posible relación estadística entre los diferentes ratios objetivados. Así se observó la existencia de una correlación positiva entre los ratios sRAGE/IFM monocitos y sRAGE/linfocitos ($r=0,84$; $p=0,00$). En el estudio de regresión lineal univariante se determinó que un incremento del ratio sRAGE/IFM en monocitos de 1,667 meses se tradujo en un aumento de una unidad del ratio sRAGE/IFM en linfocitos.

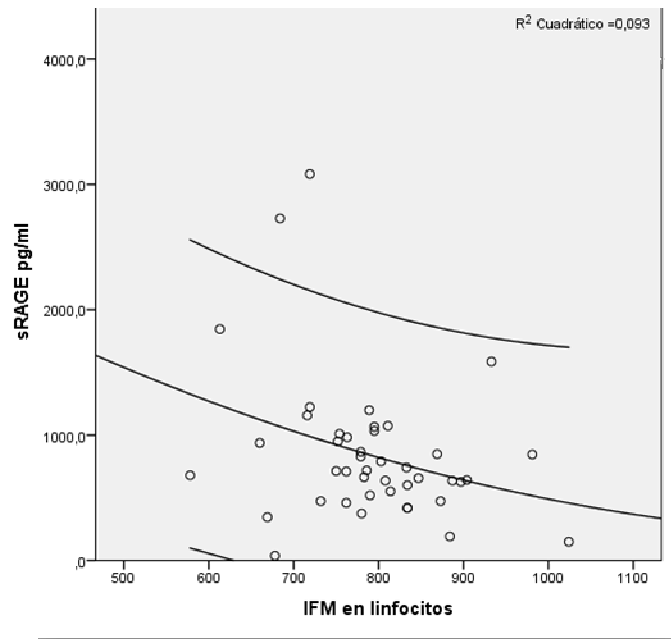


Figura 18. Correlación negativa en un gráfico de dispersión de puntos entre sRAGE e IFM de linfocitos.

1.2 Distribución de sRAGE en función del género

El valor medio de sRAGE en varones fue de 881,1 pg/ml ($DS \pm 605,3$ y mediana de 627,2) y en mujeres de 774,8 pg/ml ($DS \pm 528,46$ y mediana de 627,3). Asumida la distribución normal de sRAGE se realizó la prueba T para muestras independientes sin encontrarse diferencias en función del género ($p=0,57$).

1.3 Distribución de sRAGE en función de la edad

Se agruparon a los controles por su edad en años, de las diferentes variables ya descritas. Ver tabla 8 y figura 19.

Grupos de Edad		sRAGE pg/ml				
		Media	Máximo	Mínimo	Mediana	Rango
Grupos de Edad	Hasta 3 años	935,4	2728,7	345,7	719,0	2383,0
	4 - 7 años	816,0	1224,0	375,0	766,0	849,0
	8 - 12 años	982,7	3082,3	418,4	665,0	2663,9
	13 - 17 años	650,5	1586,7	37,7	641,7	1549,0

Tabla 8. Valores de sRAGE para los diferentes grupos de edad.

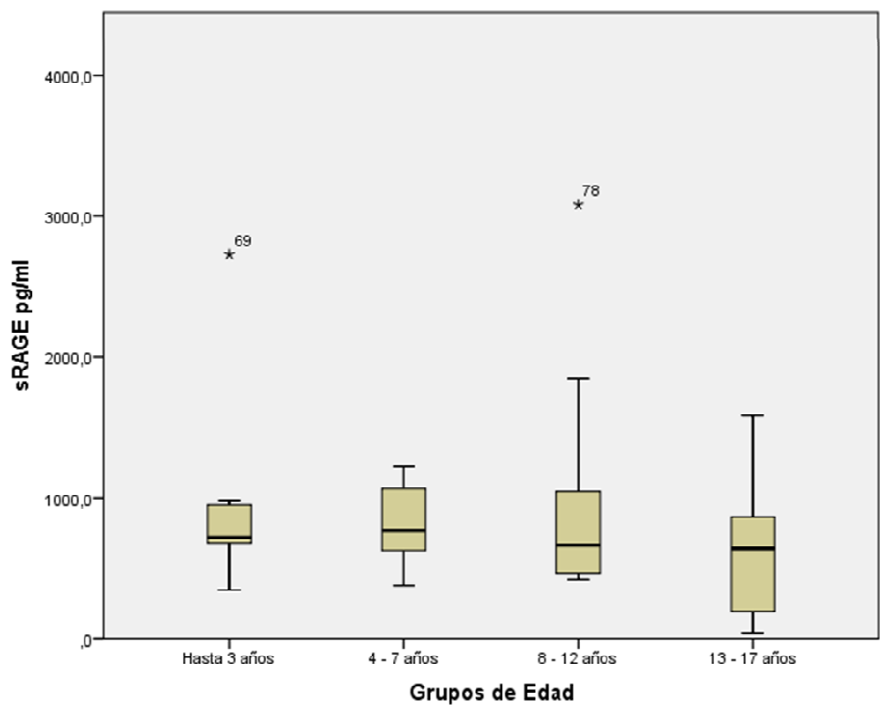


Figura 19. Distribución mediante diagrama de cajas de los valores de sRAGE en plasma en los diferentes grupos de edad.

Para el análisis estadístico de la distribución de sRAGE en función de la edad se realizaron dos valoraciones:

- Análisis de correlación: se utilizó el análisis de correlación de Pearson sin encontrarse significación (edad en meses r de -0,11 con una $p=0,47$; edad en años r de -0,11 con una $p=0,48$).
- Comparación de medias: considerando la creación de cuatro grupos etarios, y dado que el pequeño número de controles reclutados en cada uno de ellos, se realizó comparación de medias entre los grupos mediante un test no paramétrico. Así se aplicó el test ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras sin encontrarse diferencias en el valor de sRAGE ($p=0,741$).

1.4 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función del género

Se realizó la descripción de los valores de IFM en monocitos, linfocitos y suma de ambas inmunofluorescencias (Tabla 9). Se observó gran similitud en los diferentes valores obtenidos. En la figura 20 se pudo observar a su vez la distribución mediante diagrama de cajas de los valores obtenidos.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Rango
Varón	IFM en monocitos	1330	1268	2881	755	2126
	IFM en linfocitos	786	788	981	578	403
	Suma de IFM	2115,63	2032,00	3862,00	1493,00	2369,00
Mujer	IFM en monocitos	1504	1449	2467	845	1622
	IFM en linfocitos	806	789	1024	613	411
	Suma de IFM	2309,46	2277,00	3491,00	1514,00	1977,00

Tabla 9. Valores de IFM para monocitos, linfocitos y sumatorio de ambas. IFM en unidades arbitrarias de medida

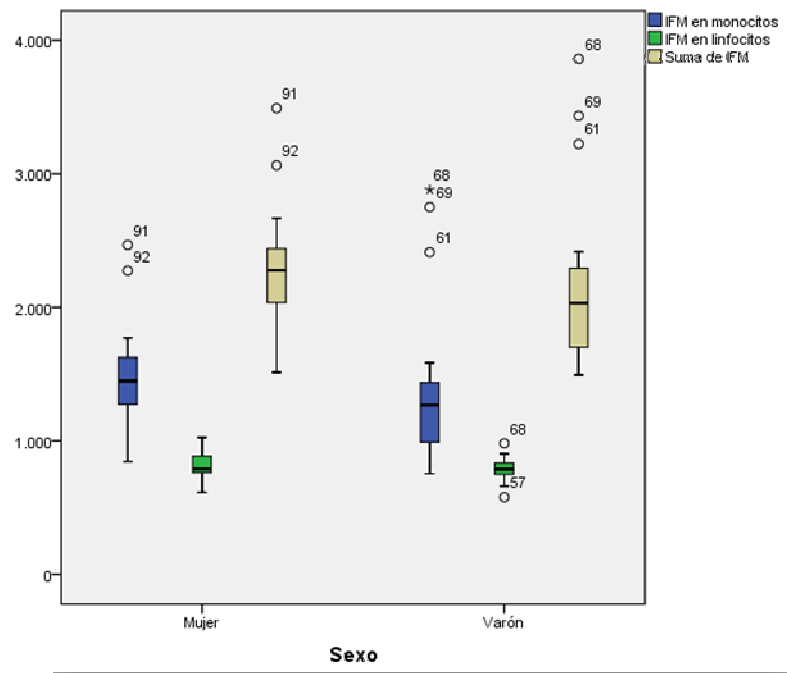


Figura 20. Distribución mediante diagrama de cajas de los valores de IFM para monocitos (azul), linfocitos (verde) y suma de ambos (marrón) en plasma en función del género.

Con los valores indicados, se comprobó mediante la prueba T para muestras independientes la ausencia de diferencias entre géneros en cuanto a las diferentes IFM.

- IFM en monocitos varón vs mujer, $p=0,30$.
- IFM en linfocitos varón vs mujer, $p=0,51$.
- IFM sumatorio varón vs mujer, $p=0,3$.

1.5 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función de la edad

De forma similar a lo realizado anteriormente se llevó a cabo, en primer lugar, el análisis descriptivo de las variables ya conocidas (Tablas 10, 11 y 12) agrupadas por la edad en años de los controles.

		IFM en monocitos				
		Media	Máximo	Mínimo	Mediana	Rango
Grupos de Edad	Hasta 3 años	1325	2751	761	1123	1990
	4 - 7 años	1588	2881	813	1406	2068
	8 - 12 años	1155	1533	755	1127	778
	13 - 17 años	1398	2467	885	1344	1582

Tabla 10. Valores de IFM para monocitos, IFM en unidades arbitrarias de medida.

		IFM en linfocitos				
		Media	Máximo	Mínimo	Mediana	Rango
Grupos de Edad	Hasta 3 años	723	786	578	752	208
	4 - 7 años	822	981	719	810	262
	8 - 12 años	766	887	613	762	274
	13 - 17 años	846	1024	678	869	346

Tabla 11. Valores de IFM para linfocitos, IFM en unidades arbitrarias de medida.

		Suma de IFM				
		Media	Máximo	Mínimo	Mediana	Rango
Grupos de Edad	Hasta 3 años	2047,9	3435	1493	1862	1942
	4 - 7 años	2409,57	3862	1646	2231	2216
	8 - 12 años	1921,27	2367	1538	2014	829
	13 - 17 años	2243,67	3491	1639	2277	1852

Tabla 12. Valores de suma de IFM, IFM en unidades arbitrarias de medida.

El análisis estadístico de los valores de IFM se realizó con intención de conocer dos hechos:

1. *Correlación entre los diferentes valores de IFM y la edad en el grupo control:* para ello se realizó la prueba de correlación de Pearson, donde se objetivó que existe una correlación positiva entre la edad y el valor de IFM linfocitos ($r=0,4$; $p=0,008$, Figura 21).

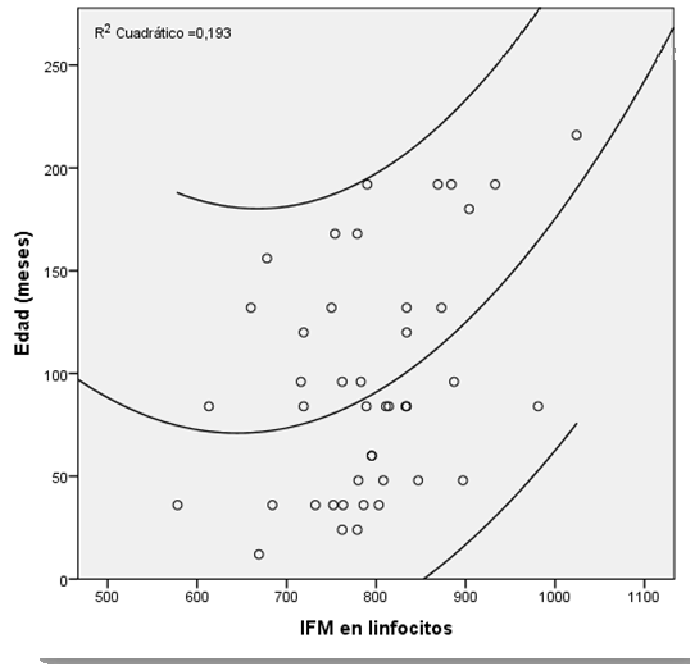


Figura 21. Correlación mostrada en un gráfico de dispersión de puntos entre la edad en meses y la IFM en linfocitos.

En el estudio de regresión lineal univariante un incremento en la edad de 0,634 meses (azul) se tradujo en un aumento de una unidad arbitraria de medida de inmunofluorescencia de RAGE en linfocitos.

2. *Diferencias de IFM entre los grupos de edad creados para el estudio:* en relación al bajo número de casos incluidos en cada grupo etario, y asumiendo la posible influencia de esto sobre la distribución de las variables a estudio, se realizó la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras (test no paramétrico) encontrándose diferencias significativas del valor de IFM en linfocitos para los diferentes grupos de edad ($p=0,006$).

1.6 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y

sRAGE/IFM en ambos en función del género

En la tabla 13 se describen los diferentes ratios observados. Posteriormente mediante la prueba T para muestras independientes no se hallaron diferencias en función del género en el valor del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Rango
Ratio sRAGE/IFM en monocitos	Varón	,69	,56	2,35	,03	2,32
	Mujer	,58	,41	1,70	,06	1,64
Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	Varón	1,15	,93	4,29	,06	4,23
	Mujer	1,02	,70	3,01	,15	2,86
Ratio sRAGE/IFM de la suma	Varón	,42	,36	1,52	,02	1,50
	Mujer	,36	,24	1,09	,04	1,04

Tabla 13. Valores de los diferentes ratios en varones y mujeres.

1.7 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y

sRAGE/IFM en ambos en función de la edad

De modo semejante a lo ya realizado se determinó la distribución de los diferentes ratios agrupando los controles por edad (Tablas 14, 15 y 16).

	Ratio sRAGE/IFM en monocitos					
	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Hasta 3 años	9	,68	,61	1,11	,41	,25
4 - 7 años	14	,55	,49	,94	,29	,22
8 - 12 años	11	,88	,86	2,35	,27	,65
13 - 17 años	9	,52	,53	1,18	,03	,42

Tabla 14. Valor del ratio sRAGE/IFM monocitos en los diferentes grupos de edad.

	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos					
	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Hasta 3 años	9	1,31	1,06	3,99	,52	1,04
4 - 7 años	14	1,00	,88	1,70	,48	,37
8 - 12 años	11	1,36	,85	4,29	,50	1,22
13 - 17 años	9	,77	,71	1,70	,06	,57

Tabla 15. Valores del ratio sRAGE/IFM linfocitos en los diferentes grupos de edad.

	Ratio sRAGE/IFM de la suma					
	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Hasta 3 años	9	,43	,37	,79	,23	,18
4 - 7 años	14	,35	,32	,60	,22	,13
8 - 12 años	11	,53	,43	1,52	,18	,42
13 - 17 años	9	,31	,29	,70	,02	,24

Tabla 16. Valores del ratio sRAGE/IFM de la suma en los diferentes grupos de edad.

Para el estudio estadístico de la distribución de los diferentes ratios en función de la edad se realizaron dos valoraciones.

1. Se determinó la ausencia de correlación entre los valores del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM y la edad.
2. Mediante la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras (test no paramétrico) se descartó la presencia de diferencias significativas para el ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en los diferentes grupos de edad.

2. RAGE y sRAGE: análisis descriptivo de casos

Del mismo modo que se realizó en los controles sanos, se determinaron en los 54 casos reclutados los valores de sRAGE, inmunofluorescencia media (IFM) de RAGE en unidades arbitrarias de medida en monocitos y linfocitos, suma de IFM, ratio sRAGE/IFM en monocitos, ratio sRAGE/IFM en linfocitos y ratio sRAGE/IFM:

	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
sRAGE pg/ml	651,0	529,0	2692,7	109,0	558,1
IFM en monocitos	126	39	1752	0	269
IFM en linfocitos	53	6	425	0	100
Suma de IFM	179,26	72,50	1752,00	,00	318,40
Ratio sRAGE/IFM en monocitos	5,31	2,59	23,41	,44	6,17
Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	22,75	1,12	358,40	,00	71,32
Ratio sRAGE/IFM de la suma	14,01	1,39	296,23	,00	53,81

Tabla 17. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos.

Con intención de comprobar si los diferentes valores obtenidos cumplen criterios de normalidad en su distribución se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En este caso el ratio sRAGE/IFM en monocitos es el único que mostró este tipo de distribución ($p=0,63$). Se especificará para cada uno de los análisis estadísticos realizados el tipo de test realizado en función de las características de la muestra.

2.1 Correlación entre los valores de sRAGE e inmunofluorescencia media de RAGE en las células mononucleares de sangre periférica

Se estudió la posible existencia de correlación entre los valores de sRAGE en plasma y la presencia de RAGE en la superficie de las PBMCs. Con intención de comprobar este punto se lleva a cabo los siguientes análisis:

1. En primer lugar se determinó la posible existencia de una correlación lineal entre los diferentes valores de sRAGE y los valores de IFM en monocitos, linfocitos y el sumatorio de ambas IFM. Se obvia añadir a este análisis los diferentes ratios, dado que al depender el ratio

del valor de ambas variables la aparición de correlaciones es segura y sin implicación en cuanto la cinética de sRAGE. Para ello se realizó el test de correlación de Spearman sin obtenerse significación estadística alguna.

2. Posteriormente se analiza la presencia de una correlación entre la IFM de RAGE en monocitos y linfocitos. Así se observó una correlación positiva estadísticamente significativa ($r=0,352$, $p=0,009$). Posteriormente, en la regresión lineal univariante se observó, que el incremento en 0,950 unidades arbitrarias de medida de la IFM en linfocitos se tradujo en el aumento de una unidad arbitraria de medida de la IFM en monocitos.

3. Finalmente también se comprobó una correlación positiva estadísticamente significativa para los ratios sRAGE/IFM en monocitos y sRAGE/IFM en linfocitos ($r=0,454$, $p=0,015$). Así, en la regresión lineal univariante se comprobó que en 0,402 unidades del ratio sRAGE/IFM en linfocitos se tradujo en el aumento de una unidad ratio sRAGE/IFM en monocitos.

2.2 Distribución de sRAGE en función del género

Se reclutaron 30 mujeres y 24 varones. Los valores de sRAGE para ambos grupos fueron los siguientes, en la figura 25 se observa su distribución en un diagrama de cajas:

- Mujeres: media de 698,5 pg/ml, $DS\pm 671$ y mediana de 501,4 pg/ml.
- Varones: media de 593,6 pg/ml, $DS\pm 387$ y mediana de 561,9 pg/ml.

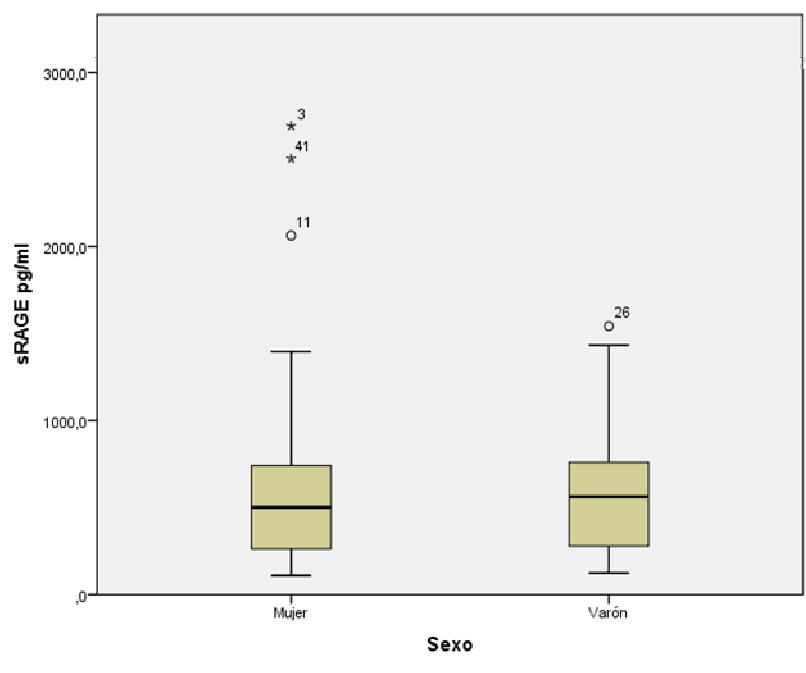


Figura 22. Distribución mediante diagrama de cajas de los valores de sRAGE en el plasma de sangre periférica de los casos (mujeres vs varones).

Puesto que sRAGE no presenta una distribución normal se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras independientes, sin hallarse diferencias en el valor de sRAGE en función del sexo ($p=,90$).

2.3 Distribución de sRAGE en función de la edad

Se realizó a continuación la descripción de los valores de sRAGE en los casos en función de la edad. Se aplica la misma distribución etaria que en pacientes sanos (Tabla 18).

		sRAGE pg/ml					
		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Grupos de Edad	Hasta 3 años	34	648,5	531,6	2692,7	145,4	537,1
	4 - 7 años	18	651,1	440,4	2504,9	109,0	626,4
	8 - 12 años	2	732,6	732,6	732,6	732,6	ND

Tabla 18. Valores de sRAGE para los diferentes grupos de edad. ND: no determinada por solo derivarse de dos casos.

Para el análisis estadístico de la distribución de sRAGE en función de la edad se realizaron dos valoraciones.

1. En primer lugar se descartó mediante el análisis de correlación de Spearman la existencia de una posible correlación entre los valores de sRAGE y la edad en meses y años de los casos.

2. Una vez analizada la correlación con la edad, se estudió la presencia de diferencias en los valores de sRAGE para los diferentes grupos. Para ello se realizó en primer lugar la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes (test no paramétrico) sin hallarse diferencias en el valor de sRAGE en función del sexo ($p=,75$). Posteriormente, y con intención de comparar los dos grupos más numerosos de casos reclutados, se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras independientes incluyendo a los pacientes de menos de 3 años y aquellos de edad entre 4 y 7 años. No se observaron diferencias significativas ($p=0,6$).

2.4 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función del género

Mediante la realización de citometría de flujo se determinó la IFM para RAGE en las PBMCs de sangre periférica de los casos. A su vez, y con intención de estimar el valor total de RAGE en superficie de membrana en PBMCs se calculó el sumatorio de ambas inmunofluorescencias. En la tabla 19 se pueden observar los valores obtenidos.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Varón	IFM en monocitos	141	20	1752	0	355
	IFM en linfocitos	37	0	228	0	64
	Suma de IFM	177,92	66,00	1752,00	,00	366,36
Mujer	IFM en monocitos	114	48	623	0	179
	IFM en linfocitos	66	9	425	0	121
	Suma de IFM	180,33	88,00	1048,00	,00	280,76

Tabla 19. Valores de IFM para monocitos, linfocitos y sumatorio de ambas. IFM en unidades arbitrarias de medida

Se realizó la test de Mann-Whitney para dos muestras independientes (test no paramétrico) sin hallarse diferencias en función del sexo para el valor de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM.

2.5 Distribución de IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y suma de ambas IFM en función de la edad

Se estudió la distribución de IFM de RAGE en PBMCs en función de la edad de los pacientes. Los valores obtenidos se indican en la tabla 20.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Hasta 3 años	IFM en monocitos	150	39	1752	0	321
	IFM en linfocitos	49	7	408	0	84
	Suma de IFM	198,26	66,00	1752,00	,00	355,87
4 - 7 años	IFM en monocitos	96	67	623	0	150
	IFM en linfocitos	66	2	425	0	130
	Suma de IFM	161,89	79,50	1048,00	,00	256,72
8 - 12 años	IFM en monocitos	0	0	0	0	0
	IFM en linfocitos	13	13	16	9	5
	Suma de IFM	12,50	12,50	16,00	9,00	4,95

Tabla 20. Valores de IFM para monocitos, linfocitos y sumatorio de IFM para RAGE por grupos de edad. Se excluye el grupo de 13 a 17 años por no haberse reclutado ningún caso.

Se realizó a continuación el análisis estadístico de la IFM de RAGE para linfocitos y monocitos en función de la edad de los casos.

1. En primer lugar se determinó si existe correlación entre los diferentes valores de IFM y la edad en meses/años de los casos. Para ello se llevó a cabo el test de correlación de Spearman sin encontrar correlación alguna.

2. Posteriormente, y con intención de conocer si existen diferencias en los valores de IFM de RAGE en función de la edad se realizó a su vez la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras (test no paramétrico). En el citado test no se hallaron diferencias.

3. Finalmente de nuevo con la intención de comparar los dos grupos más numerosos de casos reclutados, se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras independientes incluyendo a los pacientes de menos de 3 años y aquellos de edad entre 4 y 7 años. No se objetivaron diferencias.

2.6 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función del género

Se muestran en la tabla 21 la distribución de los diferentes ratios para sRAGE e IFM. Dicho ratio se obtuvo al dividir los valores de sRAGE en pg/ml entre la IFM obtenida para las PBMCs. Para determinar si existen diferencias entre géneros para el ratio sRAGE/IFM en monocitos, puesto que es el único valor obtenido con distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov, se realizó la prueba T para muestras independientes. Así no se objetivaron diferencias ($p=0,75$). Para el resto de variables, de distribución no paramétrica, se llevó a cabo la test de Mann-Whitney para muestras independientes, que no mostró tampoco significación estadística.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Varón	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	6,42	4,40	19,91	,44	6,70
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	19,52	,00	358,40	,00	72,90
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	3,46	,82	18,86	,00	5,64
Mujer	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	4,48	2,36	23,41	,58	5,81
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	25,34	2,45	296,23	,00	71,18
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	22,46	1,56	296,23	,00	71,41

Tabla 21. Valores de los diferentes ratios sRAGE/IFM en varones y mujeres.

2.7 Distribución del ratio sRAGE/IFM en monocitos, sRAGE/IFM en linfocitos y sRAGE/IFM en ambos en función de la edad

Se realizó también la descripción y análisis de los diferentes ratios sRAGE/IFM en función de la edad. Se ofrecen sus valores en la tabla 22 con una descripción gráfica en la figura 23.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Hasta 3 años	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	34	3,66	1,74	12,78	,44	3,45
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	34	21,04	2,35	296,23	,00	67,07
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	34	18,46	1,11	296,23	,00	67,20
4 - 7 años	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	18	8,30	3,66	23,41	,58	8,73
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	18	25,97	,42	358,40	,00	83,95
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	18	4,63	1,61	23,41	,00	7,44
8 - 12 años	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	2
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	2	22,89	22,89	45,79	,00	32,38
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	2	22,89	22,89	45,79	,00	32,38

Tabla 22. Valor del ratio sRAGE/IFM monocitos, sRAGE/linfocitos y sRAGE/suma de IFM en los diferentes grupos de edad. Se excluye el grupo 13-17 años al no haberse reclutado ningún caso.

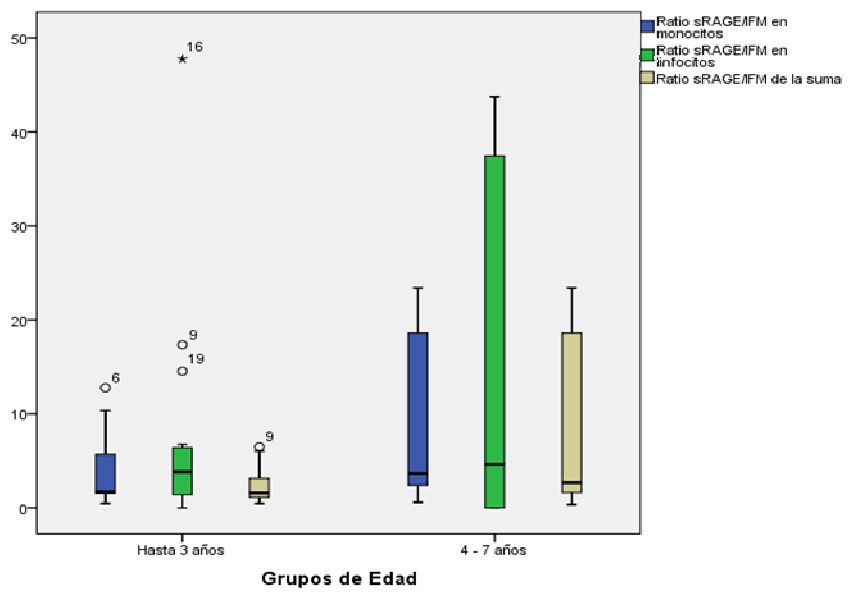


Figura 23. Distribución mediante diagrama de cajas de los diferentes ratios calculados para monocitos (azul), linfocitos (verde) y suma de ambos (marrón) en los diferentes grupos de edad.

El análisis estadístico de los diferentes ratios en función de la edad de los casos es el siguiente:

1. En primer lugar se determinó si existía correlación lineal entre los diferentes valores obtenidos y la edad en meses/años. Para ello se realizó un estudio de correlación lineal de Pearson para el ratio sRAGE/monocitos y de Spearman para el resto. Ninguno de los análisis resultó significativo.
2. Para determinar si existen diferencias entre los grupos de edad para el ratio sRAGE/IFM en monocitos se realizó la prueba T para muestras independientes (sin presentar diferencias, con una $p=0,54$).
3. Para el resto de variables, de distribución no paramétrica, se realizó a su vez la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras sin mostrar tampoco significación estadística.

3. RAGE y sRAGE: controles versus casos

En primer lugar se realizó una comparación de las características basales de los grupos. Una vez conocidas las similitudes o diferencias entre las dos poblaciones de análisis se procedió a realizar una comparación de las variables estudiadas en este trabajo.

3.1 Análisis de sanos y casos, diferencias epidemiológicas

Se estudió la distribución de la variable edad en meses o años. Para ello se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov donde se pudo observar una distribución no paramétrica de este valor ($p=0,03$). Por lo tanto, y en base a esto, se realizaron estudios no paramétricos para determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas en la edad de las dos poblaciones estudiadas (Tabla 23). Así, considerando la edad tanto en meses como en años, se objetivaron diferencias significativas entre los controles y los casos (test de Mann-Whitney para muestras independientes con una $p = 0,000$). Se debe destacar que a pesar de este hecho que las distintas variables estudiadas en relación con sRAGE y la intensidad de fluorescencia media en las diferentes poblaciones leucocitarias no mostraron correlación con la edad, a excepción de la IFM de linfocitos. Esta ausencia global de diferencia en base a la edad, si bien obliga a considerar los resultados con precaución, permite la realización de comparaciones y búsqueda de diferencias entre los controles y los casos reclutados.

		Edad en años	Edad (meses)
Sano	Mediana	7	84
	Media	8	95
	Rango	18	204
	Desviación típica	5	57
	N total	43	
Caso	Mediana	2	26
	Media	3	33
	Rango	11	130
	Desviación típica	2	25
	N total	54	

Tabla 23. Edad en casos y controles.

Considerando la distribución por género en ambos grupos observamos la siguiente distribución (Tabla 24):

		Género		
		Varón	Mujer	
Sano Vs Caso	Sano	30	13	43
	Caso	24	30	54
N total		54	43	97

Tabla 24. Distribución por género de los casos y controles.

Con intención de valorar si existen diferencias significativas en la distribución por género entre grupos se realizó el test de chi-cuadrado que confirmó estas ($p=0,013$). Se demuestra así una mayor presencia de mujeres entre los casos que entre los controles. De modo semejante a lo comentado con la variable edad, tanto sRAGE como la intensidad de fluorescencia media mostraron diferencias en función del género. De esto modo, y asumiendo limitación en los resultados obtenidos, se procedió a continuar con las comparaciones y análisis estadístico.

3.2 Análisis de sanos y casos, distribución de las variables a estudio

Se determinó la distribución, en el conjunto controles-casos, de las diferentes variables estudiadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Así se observó que ninguna de las variables presenta una distribución normal (tabla 25). Se realizaron por lo tanto estudios no paramétricos para determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas en la población estudiada.

	sRAGE pg/ml	IFM en monocitos	IFM en linfocitos	Suma de IFM	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	Ratio sRAGE/IFM de la suma
N	96	97	97	97	71	97	97
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,596	2,203	2,327	2,322	2,724	4,202	4,258
Sig. asintót. (bilateral)	,012	,000	,000	,000	,000	,000	,000

Tabla 25. Test de Kolmogorov-Smirnov de las diferentes variables estudiadas, todas con $p < 0,05$.

3.3 Comparativa sanos vs casos de los valores de sRAGE, IFM de RAGE en monocitos/linfocitos y ratios.

Se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias entre las variables a estudio. Como se puede observar en la tabla 26 y en las figuras 24 a 26 se objetivaron diferencias significativas en todos los casos a excepción del ratio sRAGE/IFM en linfocitos ($p=0,953$). Con estos hallazgos, y considerando la diferencia de edad ya descrita entre las dos poblaciones de análisis, habría que considerar con precaución los resultados obtenidos en relación a la IFM de linfocitos. Esta parece correlacionarse de forma positiva con la edad según este trabajo. De este modo, y a pesar de que el grupo control presenta una edad media menor que el de los casos, la citada diferencia comentada podría haberse visto influida con este hecho.

	Sano					Caso					Test de U-Mann Whitney
	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica	
sRAGE pg/ml	849,0	714,2	3082,3	37,7	579,0	651,0	529,0	2692,7	109,0	558,1	p=0,008
IFM en monocitos	1382	1307	2881	755	506	126	39	1752	0	269	p=0,000
IFM en linfocitos	792	789	1024	578	90	53	6	425	0	100	p=0,000
Suma de IFM	2174,23	2125,00	3862,00	1493,00	550,37	179,26	72,50	1752,00	,00	318,40	p=0,000
Ratio sRAGE/IFM en monocitos	,66	,55	2,35	,03	,43	5,31	2,59	23,41	,44	6,17	p=0,000
Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	1,11	,91	4,29	,06	,85	22,75	1,12	358,40	,00	71,32	p=0,953
Ratio sRAGE/IFM de la suma	,40	,33	1,52	,02	,27	14,01	1,39	296,23	,00	53,81	p=0,033

Tabla 26. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en casos y controles. Se muestra la significación estadística del test de Mann-Whitney.

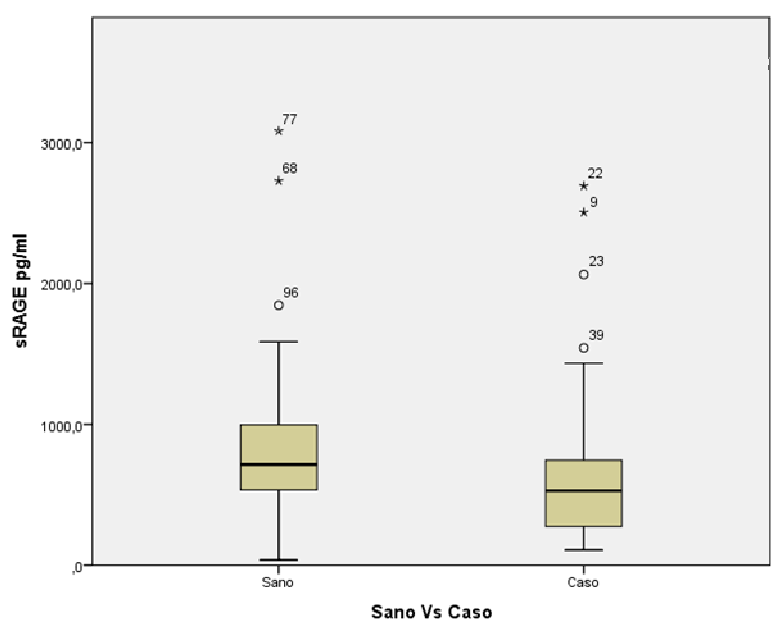


Figura 24. Distribución en diagrama de cajas de los valores de sRAGE en sanos y controles (p=0,008).

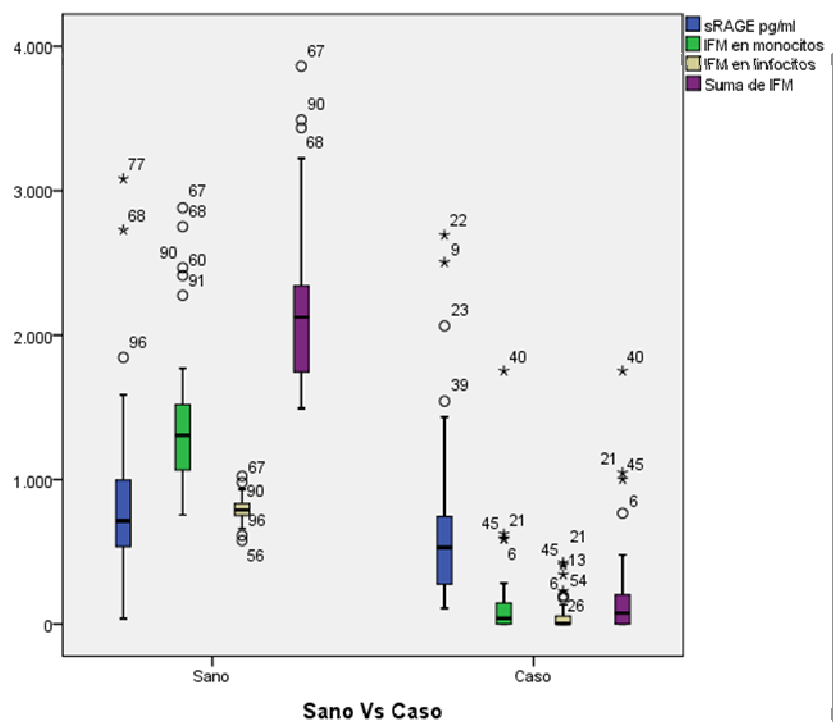


Figura 25 Distribución en diagrama de cajas de los valores de IFM de RAGE en monocitos, linfocitos y suma de IFM ($p=0,00$).

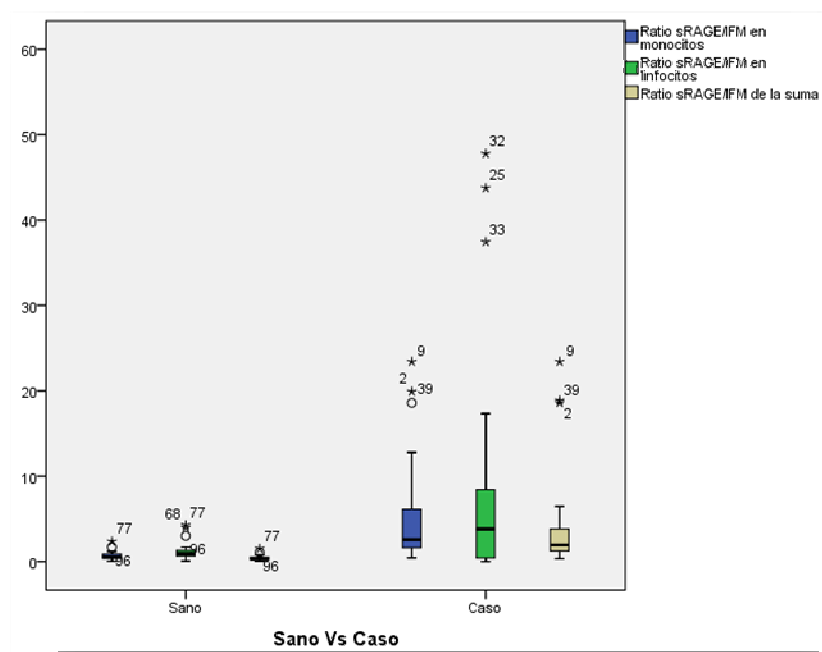


Figura 26. Distribución en diagrama de cajas de los ratios de IFM/sRAGE en monocitos, linfocitos y suma de IFM ($p=0,00$; $p=0,953$; $p=0,033$).

4. RAGE y sRAGE: análisis en los casos

Se realizó a continuación el análisis estadístico de los 54 pacientes con muestras de plasma y citometría de flujos pareados. Para ello se analizaron las diferentes variables cualitativas y cuantitativas recogidas de forma prospectiva atendiendo a los siguientes apartados:

- Antecedentes personales y anamnesis.
 - Enfermedad de base.
 - Ingresos previos por neumonía.
 - Días de fiebre.
 - Antibioterapia previa al ingreso.
- Pruebas complementarias realizadas en la atención en urgencias.
 - Diagnóstico viral.
 - Hemograma al ingreso: leucocitos, neutrófilos y plaquetas.
 - Proteína C reactiva al ingreso.
 - Radiografía de tórax.
- Tipo de neumonía al ingreso.
- Causa de ingreso hospitalario.
- Evolución durante el ingreso.
 - Días de estancia hospitalaria.
 - Días de fiebre.
 - Días con oxigenoterapia.
 - Requerimiento de ingreso en UCIP.

4.1 Antecedentes personales

En primer lugar, se realizó el análisis en función de la presencia o no de antecedentes personales de interés. Se consideraron dos grupos: pacientes con enfermedades previas versus pacientes sanos (ver anexo 1). Dada la distribución de las diferentes variables (tabla 27) se realizaron test no paramétricos para todas ellas a excepción del “Ratio sRAGE/IFM en monocitos”, que como ya se ha indicado presenta una distribución paramétrica.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Sano	sRAGE pg/ml	44	627,0	501,4	2504,9	109,0	520,8
	IFM en monocitos		129	48	1752	0	284
	IFM en linfocitos		45	4	408	0	90
	Suma de IFM		174,05	76,00	1752,00	,00	318,13
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,53	2,95	23,41	,44	6,31
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		21,24	,80	358,40	,00	69,05
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		10,70	1,55	296,23	,00	44,82
No sano	sRAGE pg/ml	10	753,8	561,9	2692,7	274,3	720,5
	IFM en monocitos		115	0	623	0	204
	IFM en linfocitos		87	31	425	0	136
	Suma de IFM		202,20	33,00	1048,00	,00	335,77
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,03	1,38	12,78	,58	5,85
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		29,40	1,12	269,27	,00	84,36
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		28,60	,46	269,27	,00	84,63

Tabla 27. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de sus antecedentes personales.

- Variables con distribución no paramétrica: se llevó a cabo el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras independientes sin hallarse diferencias en ninguno de los parámetros analizados.

- Ratio sRAGE/IFM en monocitos: no se observaron diferencias significativas entre los casos con antecedentes personales y sin ellos ($p=0,66$).

4.2 Ingreso previo por neumonía versus primer ingreso

Por el pequeño número de pacientes reclutados con ingreso previo por neumonía (8/54; Tabla 28) se decidió realizar en todos los casos análisis no paramétrico de los resultados incluso en aquellos casos en los que la distribución de los mismo cumplía las condiciones de normalidad.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
No	sRAGE pg/ml		590,5	462,6	2504,9	109,0	494,2
	IFM en monocitos		132	49	1752	0	279
	IFM en linfocitos		52	4	408	0	91
	Suma de IFM		183,54	79,50	1752,00	,00	314,33
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	46	4,72	2,36	23,41	,44	5,61
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		6,23	,70	47,77	,00	12,27
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,60	1,39	45,79	,00	7,88
Sí	sRAGE pg/ml		1048,5	888,7	2692,7	359,3	809,3
	IFM en monocitos		94	0	623	0	216
	IFM en linfocitos		61	7	425	0	148
	Suma de IFM		154,63	9,50	1048,00	,00	362,78
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	8	10,28	10,34	19,91	,58	9,67
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		117,76	9,09	358,40	,00	159,50
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		73,90	3,41	296,23	,00	129,27

Tabla 28. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función de ingresos previos por neumonía.

Se observó, sin diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney para muestras independientes, cómo el valor de sRAGE muestra un valor medio mayor en los pacientes con ingresos por neumonías anteriores ($p=0,052$).

4.3 Días de fiebre

Para el estudio estadístico de los días de fiebre previos al ingreso se realizaron dos consideraciones:

- En primer lugar se estudió si alguna de las variables estudiadas presentaba correlación con el número de días con fiebre de forma previa al ingreso.
 - Variables con distribución paramétrica: se observó una correlación con tendencia negativa con sRAGE ($p=0,072$; ver tabla 29).
 - Para el ratio sRAGE/IFM en monocitos no se observó significación estadística ($p=0,71$).

	sRAGE pg/ml	IFM en monocitos	IFM en linfocitos	Suma de IFM	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	Ratio sRAGE/IFM de la suma	Días naturales de fiebre hasta el ingreso
Coefficiente de correlación	-,251	,021	-,080	,009	-,076	,002	1,000
Sig. (bilateral)	,072	,880	,568	,947	,588	,991	.
N	52	53	53	53	53	53	53

Tabla 29. Estudio de correlación de los días de fiebre previos al ingreso y los valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios.

- Posteriormente, se distribuyó a los pacientes en función del número de días de fiebre:

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
3 o menos días	sRAGE pg/ml	638,1	534,1	2692,7	109,0	524,3
	IFM en monocitos	161	0	1752	0	353
	IFM en linfocitos	59	10	425	0	111
	Suma de IFM	219,82	39,00	1752,00	,00	406,42
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	3,25	1,79	10,34	,44	2,93
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	25,94	2,35	296,23	,00	73,49
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	22,21	1,11	296,23	,00	73,74
4 a 7 días	sRAGE pg/ml	787,5	652,4	2504,9	123,3	635,5
	IFM en monocitos	74	19	587	0	137
	IFM en linfocitos	55	0	341	0	96
	Suma de IFM	129,50	57,00	767,00	,00	198,25
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	9,76	6,04	23,41	1,09	8,22
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	22,01	,00	358,40	,00	79,83
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	6,33	1,59	45,79	,00	11,70
Más de 7 días	sRAGE pg/ml	259,1	247,1	387,4	112,6	111,9
	IFM en monocitos	134	146	256	0	91
	IFM en linfocitos	26	8	104	0	44
	Suma de IFM	160,20	156,00	360,00	,00	129,49
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	1,80	1,66	2,36	1,51	,38
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	12,40	3,73	43,75	,00	18,51
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	1,29	1,52	2,24	,00	,83

Tabla 30. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de los días de fiebre.

Con intención de analizar las posibles diferencias en función de los días de fiebre agrupados, se realizó un estudio comparativo entre ellos:

- Para los valores que no presentaron una distribución normal se realizó el ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras, sin objetivarse significación estadística entre ninguno de los grupos.
- En el caso de el “Ratio sRAGE/IFM en monocitos” sí se observaron diferencias significativas ($p=0,014$) siendo mayor este ratio en aquellos que consultaron entre el cuarto y séptimo día de fiebre.

	Ratio sRAGE/IFM en monocitos					
	Media	Mediana	Rango	Máximo	Mínimo	Recuento
3 o menos días	3,25	1,79	9,90	10,34	,44	28
4 a 7 días	9,76	6,04	22,32	23,41	1,09	20
Más de 7 días	1,80	1,66	,85	2,36	1,51	5

Tabla 31. Ratio de sRAGE/IFM en monocitos en función de los días de fiebre.

4.4 Antibioterapia

Con intención de conocer la posible influencia del inicio de antibioterapia de forma previa al ingreso, se distribuyó a los pacientes en dos grupos (Tabla 32). Posteriormente se realizó una comparación entre los valores ya descritos en función de su distribución estadística. Así para las variables de distribución no paramétrica la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes descartó la presencia de diferencias. Este hecho se repite al considerar el “Ratio sRAGE/IFM en monocitos”, dónde tampoco se observan diferencias significativas ($p=0,167$).

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
No	sRAGE pg/ml	636,1	457,1	2692,7	109,0	545,8
	IFM en monocitos	142	48	1752	0	306
	IFM en linfocitos	52	5	425	0	104
	Suma de IFM	194,11	62,50	1752,00	,00	357,04
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	4,28	2,36	18,59	,44	4,68
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	20,71	,42	296,23	,00	63,77
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	16,97	1,25	296,23	,00	63,66
Sí	sRAGE pg/ml	685,4	590,7	2504,9	112,6	602,4
	IFM en monocitos	89	20	587	0	152
	IFM en linfocitos	55	10	341	0	93
	Suma de IFM	144,00	76,00	767,00	,00	204,62
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	7,89	4,84	23,41	1,09	8,75
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	27,60	2,58	358,40	,00	88,92
	Ratio sRAGE/IFM de la suma	6,98	1,61	45,79	,00	12,53

Tabla 32. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de haber recibido antibioterapia previa al ingreso.

4.5 Diagnóstico viral

Se agrupó a los pacientes en función de la realización o no de test rápido para diagnóstico viral al ingreso (ver tabla 33). Posteriormente se realizó el test no paramétrico la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes considerando los grupos descritos sin objetivarse diferencias. En este caso se aplicó el análisis no paramétrico para todas las variables dado el bajo número de casos a comparar.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
No	sRAGE pg/ml	22	541,7	398,4	2504,9	112,6	488,3
	IFM en monocitos		108	85	623	0	145
	IFM en linfocitos		57	12	425	0	100
	Suma de IFM		164,77	91,50	1048,00	,00	238,37
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,50	2,81	23,41	,58	5,91
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		8,51	3,26	45,79	,00	14,28
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		5,18	1,66	45,79	,00	10,53
Sí	sRAGE pg/ml	32	728,5	589,6	2692,7	109,0	598,3
	IFM en monocitos		139	0	1752	0	331
	IFM en linfocitos		51	2	408	0	101
	Suma de IFM		189,22	28,00	1752,00	,00	366,85
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		6,02	2,35	19,91	,44	6,50
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		32,55	,00	358,40	,00	91,19
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		20,09	,97	296,23	,00	69,15

Tabla 33. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de la realización de diagnóstico rápido de infección viral al ingreso.

Posteriormente se estudió la existencia de diferencias entre las variables estudiadas en aquellos 32 pacientes en los que se realizó un test rápido para el diagnóstico de infección viral (Tablas 34 y 35). A destacar que todos los casos positivos en este test lo fueron por infección por virus respiratorio sincitial. En el análisis estadístico realizado, también mediante pruebas no paramétricas, se descartó la existencia de diferencias. Se debe destacar la existencia de valores más elevados, sin presentar significación, tanto de sRAGE como de las diferentes IFM en aquellos con test viral positivo (tabla 35).

		Diagnóstico viral realizado	
		No	Sí
Tipo de neumonía al ingreso	Atípica	0	5
	Indiferenciada	1	13
	Típica	21	13

Tabla 34. Comparación mediante Chi-cuadrado de la realización de test viral en función del tipo de neumonía al ingreso. Se realiza con mayor frecuencia este test en caso de neumonía atípica o indiferenciada ($p=0,001$).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Negativo	sRAGE pg/ml	23	692,4	538,3	2063,7	109,0	544,6
	IFM en monocitos		86	0	594	0	138
	IFM en linfocitos		55	3	408	0	112
	Suma de IFM		141,0	38,00	1002,00	,00	229,37
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,96	2,35	19,91	,97	6,87
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		32,43	,00	358,40	,00	94,07
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		15,74	1,39	296,23	,00	61,37
Positivo	sRAGE pg/ml	9	816,7	639,3	2692,7	164,1	742,7
	IFM en monocitos		273	0	1752	0	586
	IFM en linfocitos		40	0	180	0	68
	Suma de IFM		312,4	10,00	1752,00	,00	594,18
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		6,16	5,72	12,78	,44	6,32
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		32,85	,00	269,27	,00	88,84
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		31,21	,44	269,27	,00	89,30

Tabla 35. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de la positividad o negatividad para el test rápido de infección viral al ingreso.

4.6 Pruebas de imagen

Se consideró la afectación radiológica en base a su localización y características.

4.6.1 Alteración unilateral vs bilateral vs normal

Se describe en la tabla 36 la distribución de las diferentes variables estudiadas.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Unilateral	sRAGE pg/ml		533,3	423,7	2063,7	112,6	386,8
	IFM en monocitos		151	0	1752	0	320
	IFM en linfocitos		64	3	425	0	116
	Suma de IFM		215,41	56,00	1752,00	,00	374,03
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	37	2,65	2,02	6,38	,44	1,84
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		13,76	,85	296,23	,00	49,13
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		10,75	1,08	296,23	,00	48,84
Bilateral	sRAGE pg/ml		915,6	671,6	2692,7	109,0	806,8
	IFM en monocitos		63	58	186	0	67
	IFM en linfocitos		26	7	134	0	40
	Suma de IFM		89,36	83,50	238,00	,00	88,53
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	14	10,09	8,63	23,41	1,62	8,19
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		51,17	5,58	358,40	,00	113,35
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		24,24	3,10	269,27	,00	70,89
Normal	sRAGE pg/ml		1542,7	1542,7	1542,7	1542,7	ND
	IFM en monocitos		42	42	83	0	59
	IFM en linfocitos		5	5	9	0	6
	Suma de IFM		46,00	46,00	83,00	9,00	52,33
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	2	18,59	18,59	18,59	18,59	ND
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		,00	,00	,00	,00	,00
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		9,29	9,29	18,59	,00	13,14

Tabla 36. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de la localización vista por radiografía de tórax de la afectación. ND: no determinada por solo tratarse de dos casos.

Se realizó el test de Mann-Whitney para muestras independientes de aquellas variables con distribución no paramétrica sin objetivarse diferencias entre grupos. A destacar tan sólo la diferencia no significativa mediante análisis no paramétrico del valor de sRAGE ($p=0,12$). En caso de aplicar prueba T para muestras independientes sí se objetivó significación que si bien no tiene validez en nuestro estudio podría ser confirmado con la inclusión de más pacientes ($p=0,01$).

Por otro lado, en relación al ratio sRAGE/IFM en monocitos sí se observaron diferencias significativas entre los pacientes con afectación radiológica unilateral vs bilateral (prueba T para muestras independientes, $p=0,001$, figura 27) siendo mayor en aquellos con afectación bilateral.

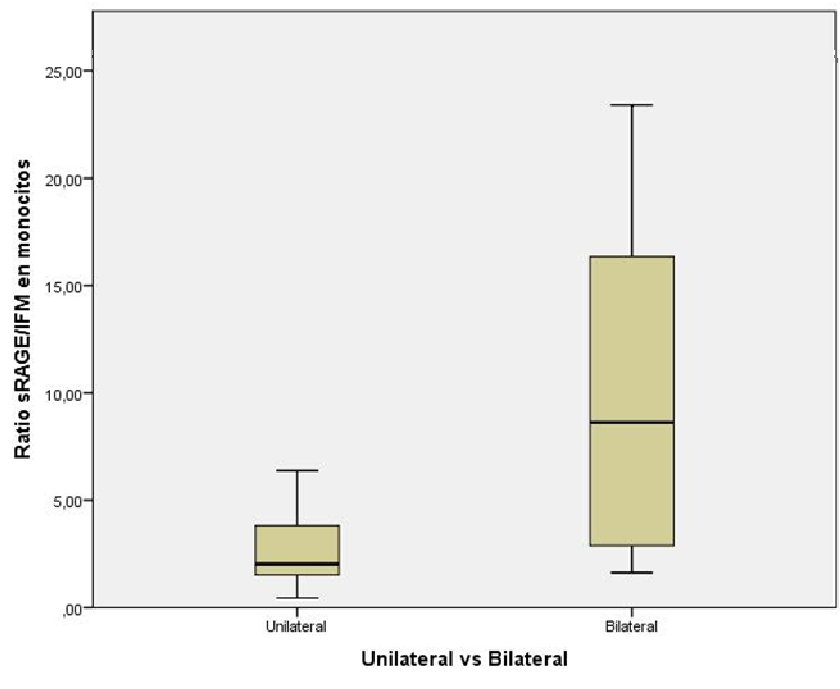


Figura 27. Valores de ratio sRAGE/IFM en monocitos e imagen radiológica; diferencia significativa entre sus valores ($p=0,001$).

4.6.2 Consolidación vs infiltrado vs derrame

Considerando estos tres grupos de afectación según el informe del radiólogo al ingreso (tabla 37), se realizó el test Kruskal-Wallis para muestras independientes de aquellas variables con distribución no paramétrica. En este análisis no se objetivaron diferencias entre grupos destacando tan sólo una tendencia en cuanto a los valores de sRAGE se refiere ($p=0,078$, figura 28).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Infiltrado	sRAGE pg/ml		822,6	633,9	2692,7	109,0	705,1
	IFM en monocitos		102	72	594	0	136
	IFM en linfocitos		72	18	408	0	116
	Suma de IFM	21	174,14	122,00	1002,00	,00	227,81
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		7,33	3,98	23,41	1,55	7,31
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		49,12	3,91	358,40	,00	109,74
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		30,76	1,62	296,23	,00	84,10
Consolidación	sRAGE pg/ml		561,9	531,6	2063,7	123,3	405,3
	IFM en monocitos		146	0	1752	0	382
	IFM en linfocitos		37	0	425	0	93
	Suma de IFM	24	182,38	8,00	1752,00	,00	420,86
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,85	1,69	6,38	,44	2,24
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		5,62	,00	45,79	,00	11,89
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,54	,17	45,79	,00	9,47
Derrame	sRAGE pg/ml		298,3	312,1	423,7	112,6	113,7
	IFM en monocitos		140	150	282	0	121
	IFM en linfocitos		58	25	196	0	78
	Suma de IFM	6	197,83	174,50	478,00	,00	192,27
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		1,91	1,94	2,81	,97	,83
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		9,83	2,56	43,75	,00	17,04
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,01	,82	2,24	,00	1,02
Normal	sRAGE pg/ml		1542,7	1542,7	1542,7	1542,7	.
	IFM en monocitos		42	42	83	0	59
	IFM en linfocitos		5	5	9	0	6
	Suma de IFM	2	46,00	46,00	83,00	9,00	52,33
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		18,59	18,59	18,59	18,59	.
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		,00	,00	,00	,00	,00
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		9,29	9,29	18,59	,00	13,14

Tabla 37. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función de la alteración radiológica al ingreso.

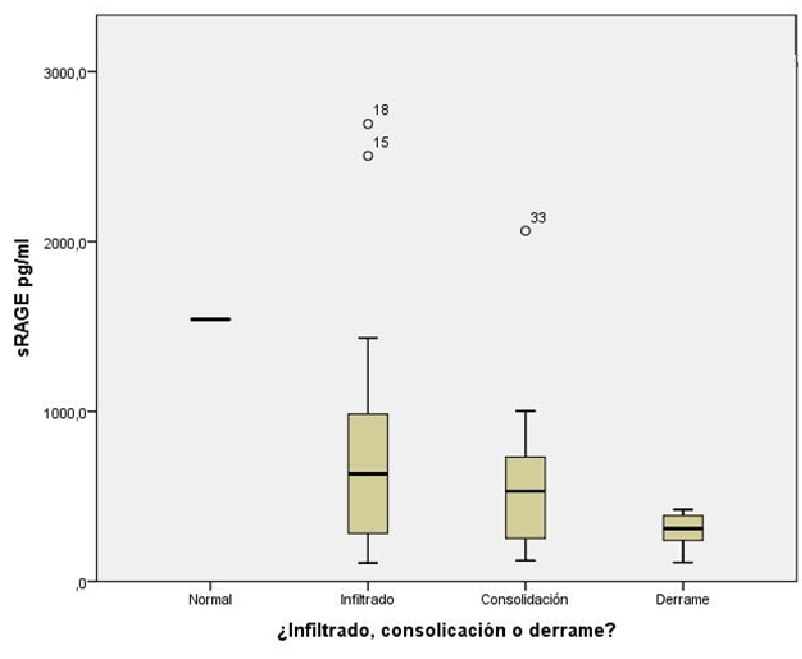


Figura 28. Distribución en diagrama de cajas de los valores de sRAGE y presencia de consolidación vs derrame vs infiltrado; no hay diferencia significativa entre sus valores ($p=0,078$). Se muestra también el valor de sRAGE en el único caso en el que no se hallaron alteraciones en la radiografía de tórax.

Sí se objetivó diferencia con significación estadística ($p=0,026$) al realizar comparación de medias mediante ANOVA de un factor para el ratio sRAGE/IFM en monocitos entre los diferentes grupos. Así este es mayor para los pacientes sin hallazgos en radiografía o con infiltrado en la misma (figura 29).

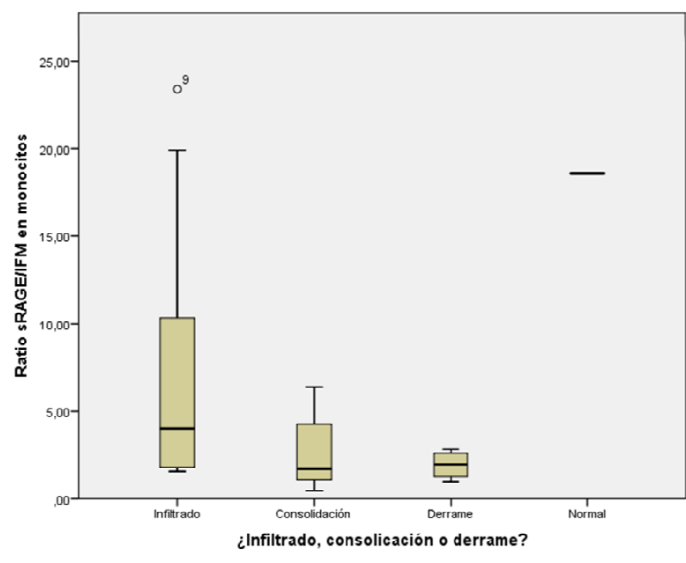


Figura 29. Distribución en diagrama de cajas de los valores de ratio sRAGE/IFM en monocitos y presencia de consolidación vs derrame vs infiltrado; no hay diferencia significativa entre sus valores ($p=0,026$). Se muestra el valor de sRAGE en el único caso en el que no se hallaron alteraciones en la radiografía de tórax.

4.7 Tipo de neumonía al ingreso

Se agrupó a los pacientes en tres tipos de neumonía al ingreso en función de la anamnesis, signos, síntomas, datos analíticos y pruebas de imagen (típica, atípica o indiferenciada, ver tabla 38). Se realizó el test Kruskal-Wallis para muestras independientes de aquellas variables con distribución no paramétrica. A pesar de no objetivarse diferencias significativas en los valores de sRAGE para los tres tipos de neumonía esta molécula podría presentar un mayor valor en pacientes con neumonía atípica o indiferenciada ($p=0,053$; Figura 30).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Típica	sRAGE pg/ml	34	500,1	398,4	2063,7	112,6	364,5
	IFM en monocitos		156	49	1752	0	321
	IFM en linfocitos		54	8	425	0	91
	Suma de IFM		210,65	72,50	1752,00	,00	360,39
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		3,03	1,69	12,78	,44	2,85
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		6,36	1,12	45,79	,00	12,03
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,02	1,09	45,79	,00	7,96
Atípica	sRAGE pg/ml	5	686,9	548,0	1542,7	109,0	683,0
	IFM en monocitos		17	0	83	0	37
	IFM en linfocitos		5	0	18	0	8
	Suma de IFM		22,00	9,00	83,00	,00	34,91
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		18,59	18,59	18,59	18,59	.
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		1,21	,00	6,06	,00	2,71
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		4,93	,00	18,59	,00	8,07
Indiferenciada	sRAGE pg/ml	14	1014,3	811,1	2692,7	198,1	773,3
	IFM en monocitos		101	65	594	0	156
	IFM en linfocitos		47	4	408	0	109
	Suma de IFM		147,64	83,50	1002,00	,00	260,88
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		9,09	6,64	23,41	1,62	8,37
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		71,78	4,74	358,40	,00	129,87
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		44,84	2,37	296,23	,00	101,19

Tabla 38. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos, diferentes ratios y tipo de neumonía al ingreso.

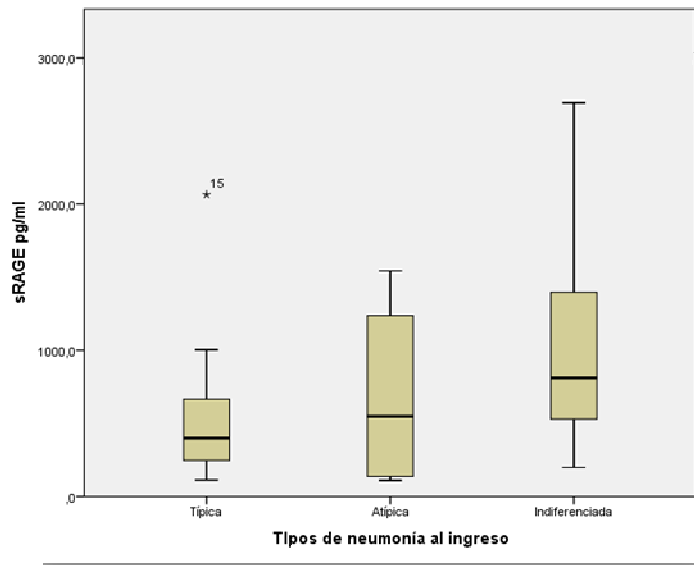


Figura 30. Distribución en diagrama de cajas de los valores de sRAGE y tipo de neumonía al ingreso ($p=0,053$).

De nuevo se objetivaron diferencia con significación estadística ($p=0,002$) al realizar comparación paramétrica de medias mediante ANOVA de un factor para el ratio sRAGE/IFM en monocitos entre los diferentes grupos. Así este resulta mayor para los pacientes con neumonía atípica al ingreso.

4.7.1 Neumonía típica vs resto de neumonías

Observando los resultados anteriormente descritos se agrupan los casos en dos series (tabla 39). Se realizó el test Kruskal-Wallis para muestras independientes de aquellas variables con distribución no paramétrica encontrándose diferencias significativas en los valores de sRAGE, siendo menor en aquellos con neumonía típica ($p=0,036$; figura 31).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Atípica o indiferenciada	sRAGE pg/ml		941,6	811,1	2692,7	109,0	747,8
	IFM en monocitos		79	0	594	0	139
	IFM en linfocitos		36	3	408	0	95
	Suma de IFM	19	114,58	18,00	1002,00	,00	229,47
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		10,14	6,91	23,41	1,62	8,44
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		53,21	,00	358,40	,00	114,90
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		34,34	1,62	296,23	,00	87,95
Típica	sRAGE pg/ml		500,1	398,4	2063,7	112,6	364,5
	IFM en monocitos		156	49	1752	0	321
	IFM en linfocitos		54	8	425	0	91
	Suma de IFM	34	210,65	72,50	1752,00	,00	360,39
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		3,03	1,69	12,78	,44	2,85
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		6,36	1,12	45,79	,00	12,03
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,02	1,09	45,79	,00	7,96

Tabla 39. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en neumonía típica vs resto.

También se objetivaron diferencias con significación estadística ($p=0,002$) al realizar comparación paramétrica de medias mediante la prueba T para el ratio sRAGE/IFM en monocitos entre los grupos neumonía típica vs resto. Así este resulta menor para los pacientes con neumonía típica (figura 31).

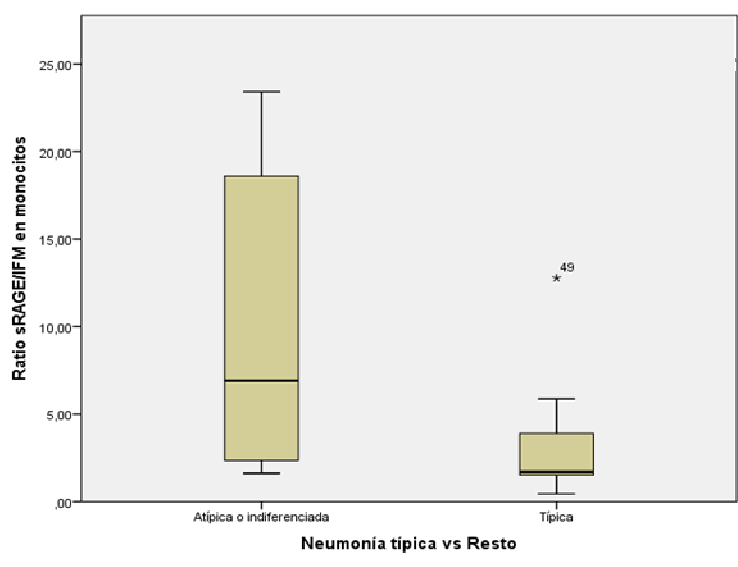


Figura 31. Distribución en diagrama de cajas de los valores de ratio sRAGE/IFM en monocitos y neumonía típica vs resto ($p=0,036$).

4.8 Motivo de ingreso

Considerando los diferentes motivos de ingreso se realizó el test Kruskal-Wallis para muestras independientes de aquellas variables con distribución no paramétrica, sin encontrarse diferencias significativas ni tendencias a reseñar (tabla 70). Igual que en los anteriores casos sí se objetivó diferencia con significación estadística ($p=0,037$) al realizar comparación de medias mediante ANOVA de un factor para el ratio sRAGE/IFM en monocitos entre los diferentes grupos. Así este parece mayor para los pacientes que ingresan con hipoxemia exclusiva al ingreso.

Puesto que esta diferencia se observó incluyendo en la comparación grupos con ocho o menos pacientes (“hipoxemia”, “no registrado” y “otros”) se realizó comparación mediante la prueba T para los dos grupos mayoritarios sin encontrarse diferencias significativas entre ellos ($p=0,78$).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Dificultad respiratoria e hipoxemia	sRAGE pg/ml	21	661,2	457,1	2063,7	109,0	540,1
	IFM en monocitos		140	115	594	0	175
	IFM en linfocitos		58	8	408	0	100
	Suma de IFM		198,33	122,00	1002,00	,00	266,81
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,22	2,35	19,91	,97	6,51
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		23,55	3,42	358,40	,00	77,87
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,10	1,11	18,86	,00	5,49
Dificultad respiratoria	sRAGE pg/ml	20	692,0	627,6	2692,7	225,4	545,1
	IFM en monocitos		78	0	623	0	151
	IFM en linfocitos		53	5	425	0	106
	Suma de IFM		130,95	13,00	1048,00	,00	251,89
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,50	2,39	12,78	,58	4,54
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		35,20	2,03	296,23	,00	85,73
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		32,11	1,32	296,23	,00	86,43

Hipoxemia	sRAGE pg/ml	2	2504,9	2504,9	2504,9	2504,9	ND
	IFM en monocitos		54	54	107	0	76
	IFM en linfocitos		5	5	9	0	6
	Suma de IFM		58,00	58,00	107,00	9,00	69,30
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		23,41	23,41	23,41	23,41	ND
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		,00	,00	,00	,00	,00
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		11,71	11,71	23,41	,00	16,55
No registrado	sRAGE pg/ml	3	402,6	351,9	633,9	222,1	210,5
	IFM en monocitos		36	0	108	0	62
	IFM en linfocitos		39	22	94	0	49
	Suma de IFM		74,67	22,00	202,00	,00	110,82
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,87	5,87	5,87	5,87	.
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		5,61	6,74	10,10	,00	5,14
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		4,41	3,14	10,10	,00	5,17
Otro	sRAGE pg/ml	8	383,0	364,3	773,4	112,6	237,9
	IFM en monocitos		261	39	1752	0	605
	IFM en linfocitos		58	0	341	0	119
	Suma de IFM		319,50	105,00	1752,00	,00	590,47
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		3,13	3,83	5,70	,44	2,07
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		1,66	,00	6,01	,00	2,63
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,60	1,65	3,83	,00	1,40

Tabla 40. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios vs causa de ingreso. ND: no determinada por solo tratarse de dos casos.

4.9 Leucocitos

Se determinó en primer lugar si alguna de las variables presenta correlación con el número de leucocitos al ingreso:

- Variables no paramétricas: se observó únicamente correlación negativa no significativa para el ratio sRAGE/IFM conjunta de monocitos y linfocitos ($p=0,44$; Rho de Spearman - 0,28, ver figura 32).

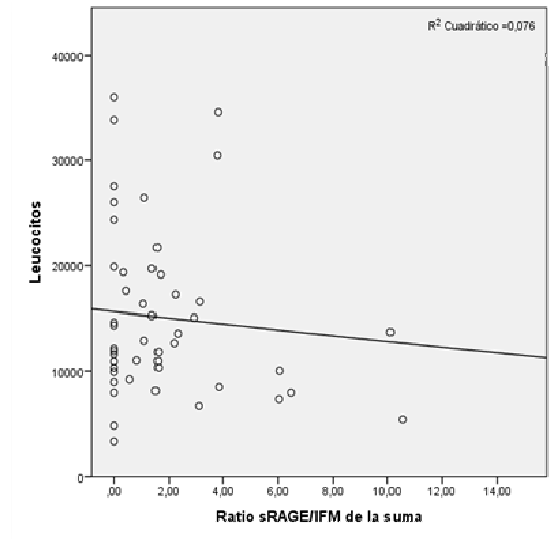


Figura 32. Correlación número de leucocitos y ratio sRAGE/IFM de la suma de monocitos y linfocitos mostrada en un gráfico de dispersión de puntos. Se objetiva una correlación negativa (Rho = - 0,28, $p=0,44$).

- Variables paramétricas: en relación al ratio sRAGE/IFM en monocitos este también mostró significación estadística con el número de leucocitos por microlitro ($p=0,01$; $r = - 0,47$; Figura 33). En el análisis de regresión lineal se comprobó que el aumento de un leucocito se traduce en el descenso de 546,6 unidades arbitrarias del ratio sRAGE/IFM de monocitos.

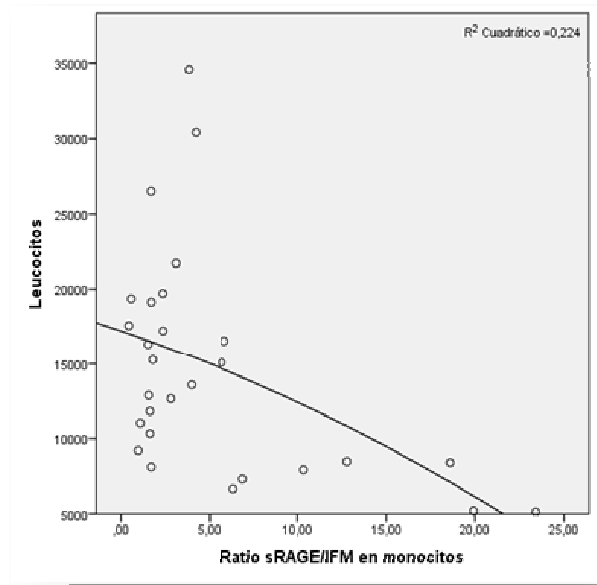


Figura 33. Correlación número de leucocitos y ratio sRAGE/IFM monocitos mostrada en un gráfico de dispersión de puntos. Se observa correlación negativa ($R = -0,47$, $p=0,01$).

Posteriormente se distribuyó a los pacientes por grupos en función del número de leucocitos al ingreso (Tabla 41):

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Menos de 5000 u/l	sRAGE pg/ml	2	349,1	349,1	534,1	164,1	261,6
	IFM en monocitos		0	0	0	0	0
	IFM en linfocitos		0	0	0	0	0
	Suma de IFM		,00	,00	,00	,00	,00
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		,00	,00	,00	,00	,00
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		,00	,00	,00	,00	,00
Entre 5000 y 15000 u/l	sRAGE pg/ml	31	708,2	589,6	2504,9	109,0	559,7
	IFM en monocitos		77	0	587	0	121
	IFM en linfocitos		44	9	341	0	77
	Suma de IFM		121,39	76,00	767,00	,00	168,07
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		7,58	3,98	23,41	,97	7,67
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		27,24	1,61	358,40	,00	81,36
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		14,92	1,62	296,23	,00	53,10
Más de 15000 u/l	sRAGE pg/ml	20	581,9	355,6	2692,7	112,6	589,1
	IFM en monocitos		221	85	1752	0	404
	IFM en linfocitos		75	8	425	0	131
	Suma de IFM		295,85	105,00	1752,00	,00	461,90
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,70	2,35	5,87	,44	1,75
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		19,21	2,03	269,27	,00	60,09
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		14,71	1,25	269,27	,00	59,93

Tabla 41. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del número de leucocitos totales al ingreso. Obsérvese que sólo dos casos presentaron menos de 5000 u/l leucocitos totales.

Comparando los tres grupos en conjunto mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para k muestras independientes no se objetivaron diferencias significativas. Con intención de evitar la posible influencia en los resultados de la inclusión del grupo de pacientes con menos de 5000 u/l leucocitos totales, se comparó de forma aislada los dos grupos más numerosos. Así

se objetivó que para el “Ratio sRAGE/IFM en monocitos”, mediante la prueba T para muestras independientes, se observaron diferencias significativas siendo este ratio mayor en los pacientes con 5000-15000 u/l ($p=0,034$). Se comprobó a su vez una tendencia a diferencias no significativas entre los valores de IFM en monocitos ($p=0,07$) y la suma de IFM ($p=0,062$).

4.10 Neutrófilos

De modo semejante a lo realizado con los leucocitos totales se realizaron dos valoraciones analíticas en relación a los neutrófilos al ingreso. En primer lugar se estudió la existencia de correlación de las variables estudiadas con el número de neutrófilos al ingreso.

- Las variables con distribución paramétrica no mostraron significación estadística mediante correlación de Spearman.
- En cuanto al ratio sRAGE/IFM en monocitos, con distribución paramétrica, este sí mostró una correlación negativa con significación estadística (en amarillo, $p=0,03$; $r = -0,41$). Se realiza posteriormente un estudio de regresión lineal univariante para el ratio sRAGE/IFM en monocitos y el número de total de neutrófilos. Se comprueba que el ratio sRAGE/IFM de monocitos y el número de neutrófilos al ingreso son variables dependientes.

Posteriormente se realizó una distribución en dos grupos en función del número de neutrófilos al ingreso estableciendo el número de corte en 7500/ μ l (mediana de los neutrófilos en la población de casos estudiada, anexo 1).

Se realizó comparación de ambos grupos con intención de establecer diferencias en los parámetros analizados. Solo se halló significación estadística para el ratio sRAGE/IFM en monocitos. Este es menor con significación estadística para aquellos que presentaron un número total de neutrófilos superior a 7500/ μ l (prueba T, $p=0,04$ y test de Mann Whitney $p=0,026$).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Menor de 7500/ μ l	sRAGE pg/ml		688,3	568,6	2504,9	164,1	518,9
	IFM en monocitos		54	0	282	0	73
	IFM en linfocitos		39	3	341	0	78
	Suma de IFM	27	93,74	56,00	478,00	,00	120,34
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		9,02	6,64	23,41	,97	7,96
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		30,40	,00	358,40	,00	86,92
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		16,75	1,62	296,23	,00	56,79
Mayor de 7500/ μ l	sRAGE pg/ml		603,3	373,4	2692,7	109,0	609,9
	IFM en monocitos		205	85	1752	0	368
	IFM en linfocitos		70	9	425	0	119
	Suma de IFM	26	274,96	105,00	1752,00	,00	425,62
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,54	2,07	5,87	,44	1,64
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		15,68	3,26	269,27	,00	52,83
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		11,71	1,11	269,27	,00	52,55

Tabla 42. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del número de neutrófilos totales al ingreso.

4.11 Plaquetas

Se realizaron dos valoraciones. En primer lugar se descartó la existencia de correlación de las variables no paramétricas y paramétricas estudiadas con el número de plaquetas al ingreso.

- Variables no paramétricas: correlación de Spearman, tabla 43.
- Variable paramétrica: correlación de Pearson, tabla 44.

	sRAGE pg/ml	IFM en monocitos	IFM en linfocitos	Suma de IFM	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos	Ratio sRAGE/IFM de la suma
Coefficiente de correlación	-,146	,143	-,051	,074	-,078	-,098
Sig. (bilateral)	,301	,305	,719	,598	,578	,486
N	52	53	53	53	53	53

Tabla 43. Correlación de Spearman de los valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del número de plaquetas totales al ingreso.

Ratio sRAGE/IFM en monocitos	Correlación de Pearson	-,295
	Sig. (bilateral)	,128
	N	28

Tabla 44. Correlación de Pearson de los valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del número de plaquetas totales al ingreso. Nótese que el número de pacientes en los que se puede determinar esta variable fue 28.

A pesar de la ausencia de correlación estadística de cualquiera de las variables se agrupó a los pacientes en función del número de plaquetas (tabla 45). Posteriormente, mediante el análisis estadístico pertinente para cada variable, se descartó también la diferencia intergrupos para los valores analizados.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Menos de 500000/ μ l	sRAGE pg/ml	46	679,3	534,1	2692,7	109,0	588,3
	IFM en monocitos		133	48	1752	0	288
	IFM en linfocitos		58	9	425	0	105
	Suma de IFM		190,78	76,00	1752,00	,00	338,26
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,84	2,95	23,41	,44	6,51
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		26,56	2,41	358,40	,00	76,75
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		16,28	1,55	296,23	,00	58,09
Más de 500000/ μ l	sRAGE pg/ml	7	430,6	387,4	1002,6	145,4	293,8
	IFM en monocitos		97	38	256	0	116
	IFM en linfocitos		33	0	124	0	56
	Suma de IFM		129,14	38,00	367,00	,00	167,49
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,16	1,65	3,83	1,51	1,11
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		1,00	,00	3,73	,00	1,72
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,09	1,08	3,83	,00	1,37

Tabla 45. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del número de plaquetas totales al ingreso.

4.12 Proteína C Reactiva

Se estudió la presencia de correlación entre las variables analizadas y el valor de proteína C reactiva (PCR) al ingreso (Figura 34). Así se comprobó una correlación negativa con significación estadística entre la PCR al ingreso y la IFM de monocitos al ingreso (Rho de Spearman, $p=0,036$; $r = -0,288$).

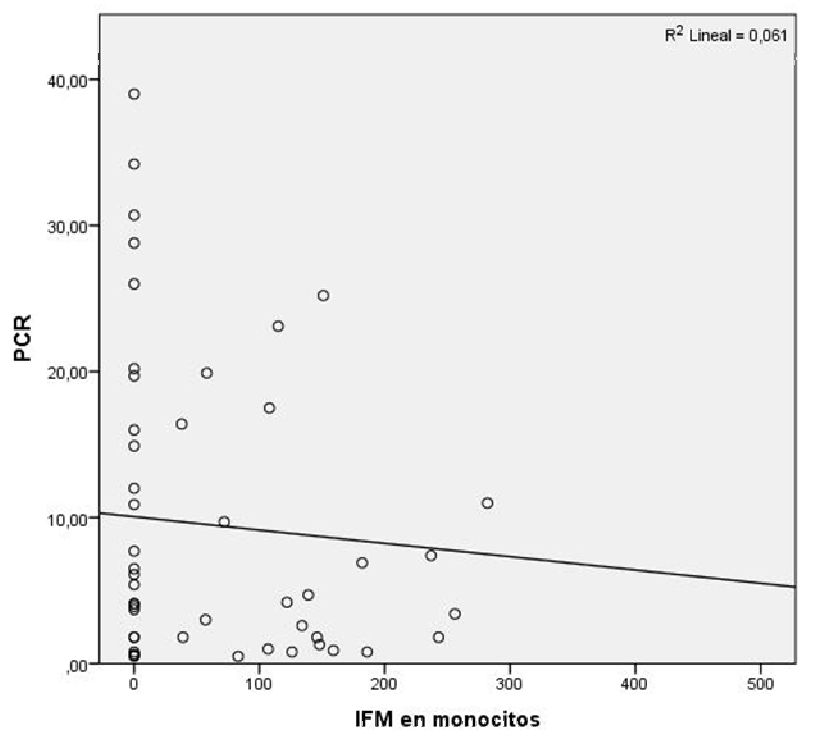


Figura 34. Correlación IFM monocitos y PCR al ingreso mostrada en un gráfico de dispersión de puntos.

Posteriormente se realizó una comparación por grupos en función del valor de PCR al ingreso (Tabla 46). Se realizó comparación de aquellos valores que mostraron correlación, sin encontrarse diferencias significativas (IFM en monocitos, test de Mann-Whitney, $p=0,073$).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación estándar
Menor de 8 mg/dl	sRAGE pg/ml		705,4	529,0	2692,7	112,6	632,9
	IFM en monocitos		169	83	1752	0	324
	IFM en linfocitos		62	3	425	0	116
	Suma de IFM		231,17	107,00	1752,00	,00	376,63
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	35	4,60	1,74	23,41	,44	6,14
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		22,18	,85	296,23	,00	66,43
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		19,73	1,39	296,23	,00	66,36
	sRAGE pg/ml		561,8	589,7	1433,6	109,0	369,8
	IFM en monocitos		46	0	282	0	76
	IFM en linfocitos		39	7	196	0	59
Mayor o igual de 8 mg/dl	Suma de IFM		84,44	20,00	478,00	,00	128,79
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	18	7,51	5,87	19,91	,97	6,63
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		23,05	,70	358,40	,00	83,79
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		3,46	1,38	18,86	,00	5,11

Tabla 46. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en los casos en función del valor de PCR al ingreso. Se establece el punto de corte en 8 mg/dl, al considerarse este valor por consenso indicativo de probable infección bacteriana

4.13 Estudio analítico de los casos: evolución global durante el ingreso

Se realizó un estudio de correlación univariante con las variables clínicas cuantitativas recogidas en este trabajo. Así se observó cómo ninguna de ellas, ya sea mediante estudio paramétrico o no paramétrico no presentan correlación con ninguna de las variables estudiadas.

4.13.1 Días de ingreso hospitalario

Se distribuyó a los pacientes en función del número de días de ingreso hospitalario (Tabla 47). Posteriormente se descartó la presencia de diferencias significativas entre los grupos mediante la prueba ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes. Dado que se objetivó que el grupo más numeroso es aquel que incluye los pacientes con menos de una semana de estancia hospitalaria se reagrupó a los pacientes con objeto de estudiar posibles diferencias (Tabla 48). También estas, mediante el test de Mann-Whitney, se descartan.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Menos de 7 días	sRAGE pg/ml	34	633,6	589,6	2692,7	112,6	503,0
	IFM en monocitos		127	0	1752	0	313
	IFM en linfocitos		52	5	408	0	97
	Suma de IFM		179,44	62,50	1752,00	,00	343,26
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,58	1,69	18,59	,44	5,15
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		21,67	,70	296,23	,00	67,12
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		20,14	1,25	296,23	,00	67,25
De 8 a 14 días	sRAGE pg/ml	11	713,6	529,0	2504,9	109,0	721,7
	IFM en monocitos		161	72	623	0	229
	IFM en linfocitos		64	4	425	0	131
	Suma de IFM		224,91	76,00	1048,00	,00	351,98
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		8,22	3,83	23,41	,58	9,48
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		38,46	,85	358,40	,00	107,03
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		5,52	1,40	23,41	,00	8,12
Más de 15 días	sRAGE pg/ml	9	638,0	423,7	2063,7	123,3	595,6
	IFM en monocitos		78	39	237	0	89
	IFM en linfocitos		45	8	228	0	75
	Suma de IFM		122,78	76,00	465,00	,00	155,78
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		3,59	3,10	5,70	2,36	1,32
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		7,63	3,22	43,75	,00	14,01
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,25	1,58	2,93	,00	1,24

Tabla 47. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función del número de días de ingreso.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Menos de 7 días	sRAGE pg/ml	36	643,1	589,6	2692,7	112,6	513,1
	IFM en monocitos		122	0	1752	0	304
	IFM en linfocitos		49	4	408	0	94
	Suma de IFM		171,58	62,50	1752,00	,00	335,05
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,48	1,69	19,91	,44	6,22
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		30,43	,70	358,40	,00	86,15
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		19,54	1,25	296,23	,00	65,39
Más de 7 días	sRAGE pg/ml	18	666,3	462,6	2504,9	109,0	652,5
	IFM en monocitos		133	73	623	0	188
	IFM en linfocitos		61	13	425	0	112
	Suma de IFM		194,61	91,50	1048,00	,00	290,81
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		5,05	3,10	23,41	,58	6,37
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		7,41	2,03	47,77	,00	14,31
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		2,95	1,49	23,41	,00	5,47

Tabla 48. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función de estancia superior o inferior a 7 días.

4.13.2 Días con oxígeno en planta

Se realizó una distribución en función de los días de oxigenoterapia (Tabla 49) sin objetivarse diferencias en el test de ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes. De forma semejante a la variable anterior se agrupó a los pacientes en función de requerir oxigenoterapia más o menos de 3 días (se toma como valor de referencia la mediana de días de oxigenoterapia, tabla 50). Posteriormente se descartaron diferencias mediante el test de Mann-Whitney.

			Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
¿Cuántos días requirió oxígeno?	0-3	sRAGE pg/ml	27	653,4	547,6	2692,7	112,6	556,3
		IFM en monocitos		147	39	1752	0	345
		IFM en linfocitos		47	0	408	0	101
		Suma de IFM		194,00	76,00	1752,00	,00	374,99
		Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,53	2,35	18,59	,44	4,73
		Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		16,53	,00	269,27	,00	52,38
		Ratio sRAGE/IFM de la suma		13,76	1,39	269,27	,00	51,88
	4-7	sRAGE pg/ml	16	687,0	529,0	2504,9	164,1	598,7
		IFM en monocitos		51	0	282	0	84
		IFM en linfocitos		37	4	196	0	61
		Suma de IFM		88,56	15,50	478,00	,00	134,94
		Ratio sRAGE/IFM en monocitos		10,87	9,58	23,41	,97	9,42
		Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		43,42	,70	358,40	,00	111,47
		Ratio sRAGE/IFM de la suma		23,00	,99	296,23	,00	73,23
	Más de 7	sRAGE pg/ml	11	595,8	423,7	2063,7	109,0	554,8
		IFM en monocitos		183	146	623	0	224
		IFM en linfocitos		92	18	425	0	135
		Suma de IFM		275,00	163,00	1048,00	,00	347,22
		Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,23	2,36	3,98	,58	1,19
		Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		7,97	3,55	43,75	,00	12,73
		Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,55	1,52	6,06	,00	1,76

Tabla 49. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función del número de días con oxigenoterapia.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Tres o menos días	sRAGE pg/ml	27	653,4	547,6	2692,7	112,6	556,3
	IFM en monocitos		147	39	1752	0	345
	IFM en linfocitos		47	0	408	0	101
	Suma de IFM		194,00	76,00	1752,00	,00	374,99
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		4,53	2,35	18,59	,44	4,73
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		16,53	,00	269,27	,00	52,38
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		13,76	1,39	269,27	,00	51,88
Cuatro o más días	sRAGE pg/ml	27	648,4	479,3	2504,9	109,0	570,9
	IFM en monocitos		105	0	623	0	166
	IFM en linfocitos		59	9	425	0	100
	Suma de IFM		164,52	56,00	1048,00	,00	256,11
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		6,22	2,81	23,41	,58	7,60
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		28,97	3,22	358,40	,00	86,86
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		14,27	1,40	296,23	,00	56,66

Tabla 50. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función de haber recibido tres o más días de oxigenoterapia.

4.13.3 Días de fiebre durante el ingreso

Se agrupó a los pacientes en función del número de días de fiebre (se considera como punto de corte el valor de la mediana, anexo 1, tabla A11). Se realizó el test de ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para k muestras independientes considerando los grupos sin objetivarse diferencias. Cabe destacar que los valores de sRAGE son superiores, sin significación estadística ($p=0,1$) para el grupo de pacientes con un día o menos de fiebre durante la hospitalización. De modo contrario parecen inferiores en relación a la IFM de RAGE en monocitos para esta misma población ($p=0,16$).

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
Un día	sRAGE pg/ml		717,4	589,7	2692,7	164,1	544,1
	IFM en monocitos		75	0	594	0	130
	IFM en linfocitos		53	7	408	0	100
	Suma de IFM		127,93	36,00	1002,00	,00	210,04
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	28	6,64	2,07	19,91	1,51	7,00
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		26,80	,80	358,40	,00	82,49
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		13,83	1,11	269,27	,00	50,97
Dos o más días	sRAGE pg/ml		582,0	355,6	2504,9	109,0	574,7
	IFM en monocitos		181	85	1752	0	360
	IFM en linfocitos		54	5	425	0	101
	Suma de IFM		234,54	91,50	1752,00	,00	401,43
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos	26	4,32	2,95	23,41	,44	5,48
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		18,39	1,12	296,23	,00	58,29
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		14,21	1,66	296,23	,00	57,72

Tabla 51. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función de haber mostrado uno o más días de fiebre en el ingreso.

4.14 Estudio analítico de los casos: análisis en función de los valores de la mediana

Se agrupó a los pacientes en función de los datos de cada variable estudiada considerando su distribución en función de los valores de mediana. Se obtienen así dos categorías para cada variable: menor o igual a la mediana y por encima de la mediana. Para el estudio de estos subgrupos se realizó estudio no paramétrico dado el bajo número de pacientes para cada nueva categoría (test de Mann-Whitney). En este nuevo análisis se deben destacar los siguientes hallazgos:

- Valor de sRAGE: los pacientes con un valor de sRAGE superior a la mediana mostraron, sin significación estadística, tendencia a estar menos tiempo ingresados ($p=0,066$; tabla 52) y tendencia a presentar más días de fiebre ($p=0,062$; tabla 53).

		N total	Media	Desviación típica	Máximo	Mediana	Mínimo
Valor en función de la mediana de sRAGE	Menor o igual a la mediana	27	11	12	58	6	3
	Mayor de la mediana	26	7	5	25	5	3

Tabla 52. Distribución de los pacientes en función del valor de sRAGE y mediana del total, se distribuyen en función de los días de ingreso.

		N total	Media	Desviación típica	Máximo	Mediana	Mínimo
Valor en función de la mediana de sRAGE	Menor o igual a la mediana	27	5	7	29	2	0
	Mayor de la mediana	26	2	2	7	1	0

Tabla 53. Distribución de los pacientes en función del valor de sRAGE y mediana del total, se distribuyen en función de los días con fiebre en planta.

- Valor de ratio sRAGE/monocitos: en este caso se objetivó significación estadística ($p=0,029$; tabla 54 y figura 35), así los pacientes con un ratio más elevado requieren más días de ingreso hospitalario. Se observó una tendencia semejante en relación al número de días con fiebre en planta.

		N total	Media	Desviación típica	Máximo	Mediana	Mínimo
Valor en función de la mediana del ratio sRAGE/IFM monocitos	Menor o igual a la mediana	11	2	1	4	1	0
	Mayor de la mediana	17	6	8	29	2	1

Tabla 54. Distribución de los pacientes en función del valor de sRAGE/IFM monocitos y mediana del total, se distribuyen en función de los días de ingreso.

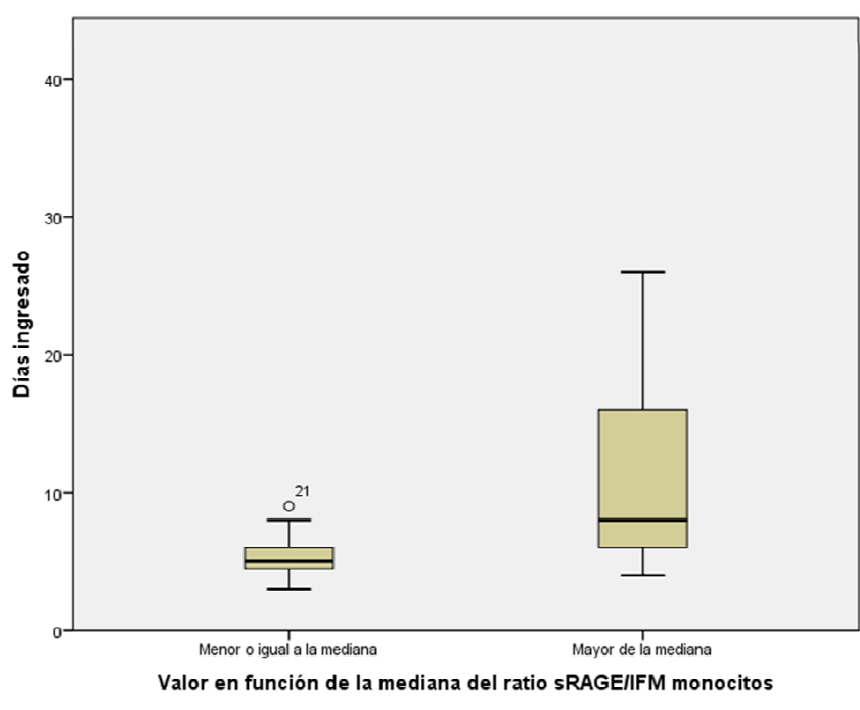


Figura 35. Distribución de los pacientes en función del valor de sRAGE/IFM monocitos y mediana del total, se distribuyen en función de los días de ingreso.

4.15 Estudio analítico de los casos: pacientes con ingreso en UCIP

Tan sólo 11 pacientes requieren ingreso en UCIP (tabla 55), se realizó análisis no paramétrico de las variables a estudio comparando estas con la de aquellos casos que no ingresaron en esta unidad.

		Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	Desviación típica
No	sRAGE pg/ml	43	677,2	568,6	2692,7	109,0	567,7
	IFM en monocitos		119	0	1752	0	290
	IFM en linfocitos		50	3	425	0	105
	Suma de IFM		169,44	56,00	1752,00	,00	337,19
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		6,29	3,83	23,41	,44	6,85
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		26,80	,00	358,40	,00	79,37
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		17,33	1,52	296,23	,00	59,98
Sí	sRAGE pg/ml	11	550,6	387,4	2063,7	123,3	533,0
	IFM en monocitos		154	148	587	0	174
	IFM en linfocitos		64	42	228	0	79
	Suma de IFM		217,64	193,00	767,00	,00	240,32
	Ratio sRAGE/IFM en monocitos		2,38	2,36	3,98	1,09	1,00
	Ratio sRAGE/IFM en linfocitos		6,94	3,55	43,75	,00	12,63
	Ratio sRAGE/IFM de la suma		1,06	1,08	2,33	,00	,96

Tabla 55. Valores de sRAGE, inmunofluorescencia media en monocitos/linfocitos y diferentes ratios en función de haber requerido ingreso en UCIP.

Si bien las diferentes variables mostraron de forma global un valor menor en los pacientes que requieren UCIP, en el test de Mann-Whitney para muestras independientes no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

4.15.1 Días de ingreso en UCIP

En los 11 casos se analizó la posible correlación de las diferentes variables a estudio con el número de días de ingreso en UCIP, sin hallarse significación estadística ya sea para las variables no paramétricas como para las paramétricas (ratio sRAGE/IFM monocitos, $p = 0,544$).

5. Utilidad clínica las variables estudiadas

Finalmente se realizó, mediante la realización de una curva COR, el estudio acerca de la posible utilidad de las diferentes variables analizadas en cuanto al diagnóstico precoz de los siguientes aspectos:

- Tipo de neumonía al ingreso: típica versus resto.
- Afectación radiológica: unilateral versus bilateral.
- Motivo de ingreso.
- Test viral positivo al ingreso.
- Evolución global del ingreso.
- Requerimiento de ingreso en cuidados intensivos: sí o no.

Se obtuvo como único resultado de interés la utilidad del ratio sRAGE/IFM de monocitos y el ratio sRAGE/IFM de la suma de RAGE en linfocitos y monocitos para anticipar la presencia de afectación unilateral y bilateral en la radiografía de tórax de ingreso (ver datos en tabla 36). Considerando la curva COR para ambos parámetros (Figura 36) los puntos de corte para cada variable que mostraron una mayor sensibilidad y especificidad para este hecho fueron los siguientes:

1. Un valor de ratio sRAGE/IFM de monocitos superior a 3,9 presentaría una sensibilidad del 75% con una especificidad del 74% para la presencia de afectación bilateral en la radiografía de tórax.
2. Un valor de ratio sRAGE/IFM de la suma de RAGE en linfocitos y monocitos superior a 2,29 presentaría una sensibilidad del 75% con una especificidad del 68% para la presencia de afectación bilateral en la radiografía de tórax.

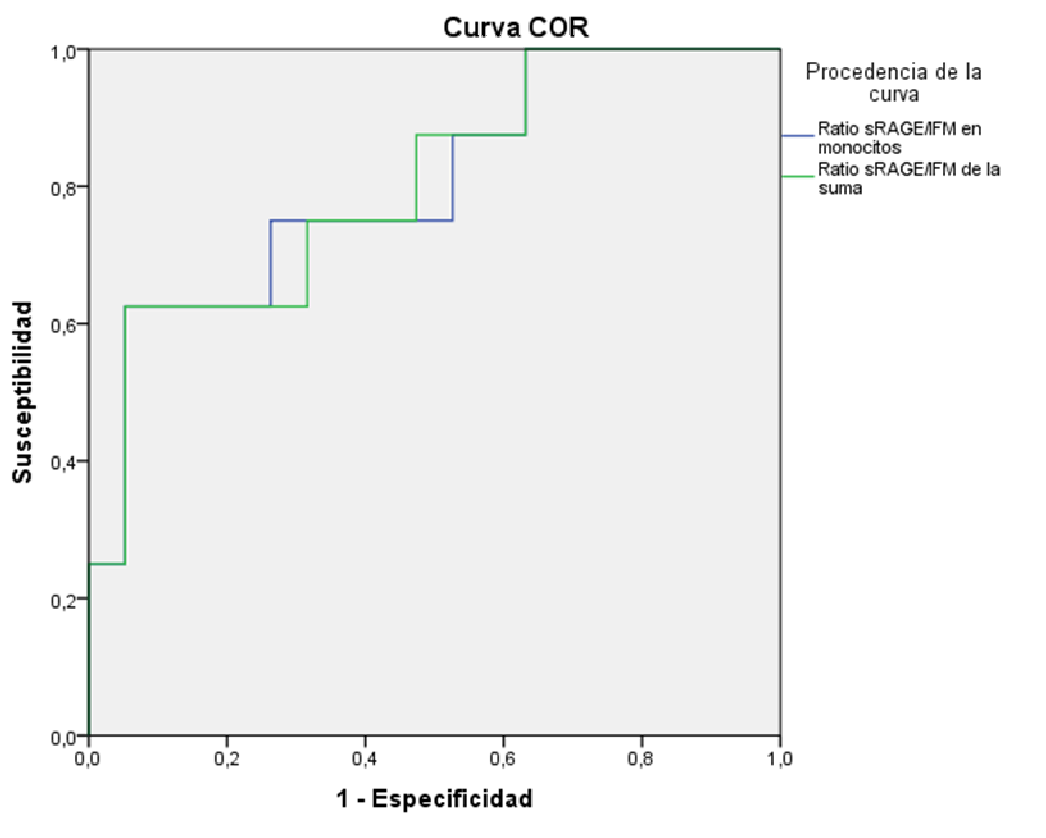


Figura 36. Curva COR para ratio sRAGE/IFM de monocitos y sRAGE/IFM de la suma de RAGE en linfocitos y monocitos y presencia de afectación bilateral en radiografía de tórax de ingreso.

	Área	Error típ.	Sig. asintótica	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Ratio sRAGE/IFM en monocitos	,803	,097	,015	,613	,992
Ratio sRAGE/IFM de la suma	,803	,095	,015	,616	,990

Tabla 56. Valores de área bajo la curva para ratio sRAGE/IFM de monocitos y sRAGE/IFM de la suma de RAGE en linfocitos y monocitos y presencia de afectación bilateral en radiografía de tórax de ingreso.

VII. Discusión

Se lleva a cabo en este trabajo el estudio del posible papel que pudiera tener el receptor para productos avanzados de glicosilación en la NAC con requerimiento de ingreso hospitalario en la población pediátrica. Para la realización del mismo fue necesario, en primer lugar, determinar los valores en niños sanos de RAGE tanto para la forma anclada a membrana como para la forma soluble circulante. Este hecho fue necesario dado que en la población pediátrica no existen datos previos acerca del valor de RAGE en superficie de linfocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y los valores referentes a sRAGE resultan escasos y dispares. Una vez hecho esto, se llevó a cabo el reclutamiento de pacientes con NAC con intención de determinar en ellos los parámetros en relación al eje RAGE ya estudiados en controles sanos. Posteriormente, tras comparar los mismos en ambas poblaciones, se exploró el papel que RAGE pudiera tener en el inicio y evolución de la NAC.

Se reclutaron 43 controles sanos, que mostraron una distribución etaria y de género diferente a los 54 casos incluidos, sin que esto parezca afectar a los resultados.

El número de controles y casos se asemeja al utilizado en trabajos previos sobre RAGE en pediatría⁸⁷. En cuanto a los resultados obtenidos se refiere, resultan de especial interés aquellos vinculados a la forma de membrana de RAGE determinada mediante citometría de flujo, puesto que no se ha estudiado nunca este aspecto ni en población pediátrica, ni en población adulta. Este trabajo supone por tanto el primer acercamiento a los valores pediátricos basales de RAGE en la superficie de células mononucleares incluyendo linfocitos, además de ser también pionero en estudiar los mismos en un contexto de enfermedad infecciosa. Nuestro trabajo confirma no sólo la presencia de RAGE en membrana de PBMCs, algo supuesto pero no demostrado, sino que también permite cuantificar esto con intención de analizar su variabilidad en la NAC^{38, 39, 42, 43, 46, 57, 64, 65, 68, 69, 79, 84, 93, 96, 97, 100, 112, 114, 126-139}.

En relación a la forma soluble sRAGE, y en cuanto a sus valores se refiere, se obtienen resultados congruentes con los trabajos previamente publicados en pediatría^{33, 87}. Por contra, al considerar los trabajos realizados en población adulta, se observan diferencias con nuestros hallazgos. Este hecho, podría relacionarse tanto con un menor estrés oxidativo dependiente de la edad como con comorbilidades o enfermedades que siendo más prevalentes en adultos influyan sobre los valores de esta molécula^{38, 57, 68, 86, 94, 120, 140-145}.

Se define también por primera vez la posible relación entre los valores de sRAGE y la forma anclada a la membrana de monocitos. Es sabido que RAGE se encuentra de forma mayoritaria y constitutiva en el territorio pulmonar^{84, 126, 140} pero, en nuestro trabajo se demuestra que RAGE se encuentra también anclado a la membrana de PBMCs y parece verse disminuido y relacionado con los valores de sRAGE en la NAC^{74, 146-148}.

1. Eje RAGE: consideraciones sobre edad y género

En relación al género no se objetivan diferencias en ninguna de las variables estudiadas. Este hecho es congruente considerando la literatura existente en población adulta^{80, 91, 101, 149, 150}. En cuanto a la intensidad de fluorescencia de RAGE no existen datos previos que permitan contextualizar los resultados obtenidos.

Los valores de sRAGE de nuestro trabajo son menores a los descritos en el adulto^{35, 95, 98, 151-154}. Sobre este hecho puede tener cierta importancia la edad del grupo estudiado puesto que el eje RAGE influye y se ve influido por los cambios inflamatorios derivados del estrés oxidativo consecuencia del envejecimiento^{57, 94, 143}. Con intención de evaluar este hecho en los casos y controles reclutados se descarta la correlación con la edad para todas las variables del eje RAGE a excepción de la IFM de RAGE en linfocitos de los controles. Este hallazgo, que obliga a considerar con precaución nuestros resultados, no había sido descrito con anterioridad. El único precedente en el que se vincula el eje RAGE con la edad en niños se encuentra en el trabajo de *Yercovich et al*³³. Se observa aumento con la edad del sRAGE determinado en territorio broncoalveolar, algo que no se repite en plasma pero que dirige a realizar nuevos trabajos que desmientan o confirmen esto.

2. Intensidad de fluorescencia media de RAGE en NAC

Resulta complejo contextualizar los hallazgos de este trabajo acerca de la IFM de RAGE. En el trabajo de *Arce-Mendoza et al* se puede observar que el valor de IFM obtenido en adultos es superior al que se describe tanto en nuestro casos como en nuestros controles. Dicha variabilidad, sobre todo en referencia a los controles, se puede poner de nuevo en relación con un menor estrés oxidativo, que derivaría en una mayor presencia de RAGE en membrana consecuencia de una menor liberación de esta molécula al torrente sanguíneo con intención antagonista^{57, 69, 94, 143}.

Se observa además que la IFM de RAGE en monocitos y linfocitos muestra una correlación positiva tanto en los controles como en los casos (*controles* $r=0,43$, $p=0,004$ y *casos* $r=0,352$, $p=0,009$). Dicha correlación sugiere un modelo de estímulo de expresión de RAGE con influencia equitativa para linfocitos y monocitos, que se comportan de forma semejante tanto en situación basal como de neumonía.

Analizando los pacientes con NAC, el valor de la IFM de RAGE en membrana de PBMCs se puede interpretar desde dos razonamientos complementarios. En primer lugar se observa que en el contexto de la NAC disminuye el RAGE de membrana en PBMCs sin implicar un aumento cuantificable de sRAGE. Partiendo del resultado obtenido en controles en relación a la IFM de RAGE y sRAGE, donde se observa una correlación negativa entre sus valores, y al considerar además la literatura al respecto,^{86, 96} sería esperable que en la NAC se produjera una variación también de sentido contrario entre estas dos formas de RAGE. En contexto de inflamación sería esperable una menor presencia en membrana y una mayor cantidad de forma circulante, dado que esta es “producto” de la liberación de la forma de membrana.

En nuestro trabajo se observa cómo este hecho no se cumple de forma completa: a pesar de producirse un descenso de la IFM de RAGE no se incrementa el valor de sRAGE. Para

explicar esto parece fundamental considerar el tipo de análisis realizado y el papel antiinflamatorio de la forma soluble. Mediante el ELISA¹²⁵ utilizado para determinar la forma soluble, se capturó la forma circulante de sRAGE probablemente libre de ligandos. A pesar de que se observa que la forma de membrana disminuye^{127, 146, 148}, la forma sRAGE puede haber sido subestimada¹²⁵. Al tiempo, y de forma complementaria, es sabido que la captura de ligandos por parte de sRAGE condiciona un cambio de expresión en RAGE de membrana. La actividad como antagonista competitivo de sRAGE no sólo disminuye la participación inflamatoria del eje RAGE^{68, 136}, se produce también un descenso en la síntesis de RAGE de membrana con aumento progresivo de la forma endosecretora o esRAGE con intención de complementar la función antiinflamatoria. Esto deriva en una menor disponibilidad de RAGE de membrana, y por lo tanto también en una menor IFM objetivada^{86, 155}.

Por otro lado, y puesto que nuestro trabajo estudia por vez primera la correlación existente entre los valores de la forma soluble y en membrana de linfocitos y monocitos, es obligado detenerse en el análisis de los resultados obtenidos a este respecto. Si existiera correlación entre ambas formas, los ratios sRAGE/IFM en los pacientes deberían verse modificados en función de la situación inflamatoria^{39, 69, 79, 94, 97, 99, 126, 127, 137, 143}. Así se observa en los casos un valor mayor del ratio en linfocitos y monocitos comparado con los controles con una correlación positiva entre ambos (figura 26, $r=0,402$ con $p=0,015$). Este informa de un incremento de la razón “sRAGE circulante y forma anclada a membrana” a pesar de que no se observa un incremento total de la forma soluble en plasma. Parece que los monocitos y linfocitos del paciente con NAC ven alterada la presencia de RAGE en membrana de PBMCs, bien mediante su liberación en forma de sRAGE bien mediante un cambio en su perfil de expresión. Esto demuestra una respuesta de RAGE de membrana a consecuencia de la situación inflamatoria subyacente^{112, 114}.

3. sRAGE en la NAC

Los valores de sRAGE obtenidos en los casos resultan menores que los hallados en los controles (mediana $529 \pm 558,1$ pg/ml vs mediana 849 ± 579 pg/ml). Considerando la evidencia existente en relación a sRAGE en el contexto de la inflamación relacionada con un proceso infeccioso, los hallazgos en nuestro trabajo podrían parecer contradictorios dado que el enfermo, que está “inflamado”, dispone de menos sRAGE para “antiinflamar” que el sano^{92, 95, 98, 156}.

Desde un punto de vista teórico sRAGE, liberándose por la acción de una metaloproteasa desde la membrana de células endoteliales y PBMCS¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, tendría que ver aumentada su concentración para llevar a cabo la actividad antagonista competitiva que se le otorga^{78, 96}. A su vez, y dado que el territorio pulmonar es el tejido mayoritariamente afecto en una neumonía, la liberación de esta isoforma desde esta región al torrente sanguíneo debería ejercer un efecto sumatorio^{77, 80, 81, 118, 157, 158}. Cumpliendo con este razonamiento en enfermedades respiratorias con base inflamatoria, de forma general, el valor de sRAGE en el individuo enfermo sería superior al del sano o “*menos enfermo*”, poniéndose este aumento en relación con el daño sobre el órgano diana, e incluso con la evolución del cuadro subyacente¹⁰⁶.

Este axioma “*inflamación es equivalente a mayor forma soluble*” si bien resulta el más aceptado no es por otra parte indiscutible. Actualmente si bien se asume que sRAGE posee actividad antagonista en contexto de inflamación, nuestro trabajo no es el primero en el que se describen valores inferiores a lo esperado. Este aspecto fue parcialmente anticipado por los artículos sobre cinética de sRAGE realizados por *Jabaudon et al* en el periodo 2011-2015. Este grupo de trabajo, partiendo de unos resultados de sRAGE menores a lo previamente publicado, describe la variabilidad y descenso de esta isoforma relacionando esta con el grado de afectación pulmonar y el tipo de enfermedad causal. Valores bajos y aislados de sRAGE pueden

verse incrementados con posterioridad, influidos por la dinámica inflamatoria del paciente^{6, 77, 78, 83, 104}.

Continuando con la evidencia existente acerca de la obtención de valores menores de sRAGE en enfermos al comparar con casos, destacan los artículos ya comentados en la introducción de Yercovich *et al*³³, El-Seify MY³³ *et al*⁹¹ y Poormina *et al*¹⁵⁹. Tal y como reconocen los autores, no resulta sencillo ofrecer una explicación para este hecho dada la estructura y actividad del eje RAGE en conjunto. En ninguno de estos trabajos se define con certeza el origen real o mayoritario de la isoforma sRAGE, ya sea desde el punto de vista tisular (*¿es sRAGE mayoritariamente de origen pulmonar?*) como celular (*¿qué influencia tiene sobre sus valores el RAGE de membrana escindido desde las células circulantes?*).

En nuestra serie, y con intención de explicar los valores de sRAGE, la información obtenida sobre el cambio en la intensidad de fluorescencia media en la forma de membrana resulta fundamental. No se observa una mayor cantidad de sRAGE circulante a pesar de que la forma de membrana se ha visto disminuida, no se cumple de este modo el axioma “*inflamación es equivalente a mayor forma soluble*”. Para este hallazgo encontramos dos explicaciones parcialmente introducidas con anterioridad. La actividad antagonista de sRAGE haría que la forma circulante se anclara a los ligandos de RAGE proinflamatorios liberados en el contexto de una neumonía adquirida en la comunidad. Dicha unión podría interferir en su análisis por ELISA obteniéndose un sRAGE subestimado¹⁵⁶. A su vez los niveles de sRAGE, en procesos agudos como la NAC, podrían disminuir de forma paulatina, en las primeras horas o días de evolución, consecuencia de su consumo como antagonista y hasta que la isoforma esRAGE sustituya su papel^{69, 86, 110, 156, 159, 160}. En nuestro trabajo los pacientes son estudiados una vez el proceso inflamatorio ha evolucionado, no conocemos el valor de partida y no se determinan los valores de la forma endosecretora o esRAGE. El papel de esRAGE en este contexto no se ha estudiado, pero se le atribuye una actividad semejante a la de sRAGE traduciendo además la puesta en

marcha de lo que podríamos denominar como "*activación del perfil antiinflamatorio de RAGE*"^{69, 86, 110, 156, 159, 160}. Sería de esperar que sus valores se vieran aumentados en caso de inflamación asociando además, y como consecuencia, una disminución de la presencia de RAGE de membrana por la modificación en la síntesis intracelular de esta molécula (Figura 4). Este hecho derivaría también, puesto que ha cambiado su expresión, en una menor disponibilidad de RAGE en membrana para su sección mediante la acción de una metaloproteasa y por lo tanto en una menor cantidad de sRAGE circulante^{146, 148, 161}.

4. Eje RAGE, papel en la NAC

Como ya se ha indicado los pacientes con NAC muestran un descenso tanto de los valores de sRAGE como de la forma de membrana determinada por citometría. Este hecho confirma que este eje se modifica y ve influido por la situación inflamatoria que acontece durante la neumonía adquirida en la comunidad.

En este trabajo el estudio del eje RAGE en los pacientes se ha realizado considerando los siguientes aspectos:

1. Antecedentes del paciente y situación clínica previa a su consulta en urgencias.
2. Variables clínico-analíticas utilizadas durante la toma de decisiones en el ingreso hospitalario.
3. Evolución durante el ingreso, complicaciones y alta.

En nuestra serie, con intención de advertir la posible influencia de procesos inflamatorios previos semejantes al estudiado se agrupó a los pacientes en base a la presencia o no de neumonías con anterioridad⁸⁴. No se recogió el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de neumonía ni la indicación o necesidad de ingreso hospitalario, algo que quizá habría resultado de interés al informar sobre una mayor inflamación previa en territorio pulmonar y, por lo tanto,

influencia sobre RAGE. Finalmente sólo ocho casos mostraron antecedente de NAC. En este pequeño grupo, con daño previo real e infeccioso sobre pulmón, se observa que el valor de la forma soluble se encuentra incrementado con una diferencia que resulta prácticamente significativa ($p=0,052$, tabla 28). Este hallazgo, y asumiendo las limitaciones consecuencia del escaso número de pacientes, podría asociarse a una afectación pulmonar residual ya vista en trabajos sobre daño pulmonar de diversas causas^{157, 162, 163}.

Continuando con la exploración sobre la situación previa al ingreso, y sabiendo que el eje RAGE es un elemento participante en procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos^{57, 115, 164}, es razonable considerar que 1) RAGE puede participar en el inicio o mantenimiento de la inflamación de la NAC y 2) la modificación de sus valores podría influir sobre los signos clínicos o analíticos que de esto se derivan. Así la fiebre, signo clínico clásico y fundamental de inflamación, podría mostrar relación con el eje RAGE^{55, 56, 165-167}.

Se puede observar en los casos como el valor de la forma soluble muestra una correlación con tendencia negativa con el número de días con fiebre previos al ingreso (tabla 29). Esto podría explicarse considerando el papel antagonista competitivo de sRAGE y su consumo en el contexto de la inflamación^{98, 168}. Así cuanto más elevados son los valores de esta forma menor es el número de días con fiebre hasta el ingreso, o lo que es lo mismo, a menor tiempo de evolución mayor “*reserva*” de esta molécula.

Se debe reconocer que la cuantificación extrahospitalaria de la fiebre es compleja, y en nuestro trabajo se decidió estudiar esta en base al número de días con fiebre antes del ingreso. Quizá se debiera haber considerado la recogida de la temperatura máxima, pero al ser un valor que habría sido determinado por los padres o cuidadores este aspecto no fue incluido. La fiebre no ha sido estudiada de forma específica en su relación con RAGE, pero el papel de este receptor sí ha sido analizado en contextos, que sin duda, presentaban fiebre¹⁰¹. Un ejemplo

fundamental de este hecho sería la sepsis, fenómeno inflamatorio con base infecciosa, que parece asociar no sólo una variación de los valores de sRAGE al comparar con sanos sino que incluso puede relacionarse con el pronóstico y resolución del cuadro subyacente^{98, 101, 102, 164}. En cuanto al comportamiento de la forma de membrana de RAGE apenas se dispone de datos previos en la literatura, y en el contexto de neumonía sólo disponemos del trabajo de *Narvaez-Rivera et al* sin que este trabajo ofrezca resultados concluyentes¹⁰⁶.

En conjunto no es posible establecer una estimación sobre la correlación esperable entre cualquiera de las formas de RAGE y la fiebre. Parece que RAGE podría participar en su establecimiento y duración, y además mostrar una modificación dinámica de sus valores en base al tiempo de fiebre. Nuestro trabajo realiza una medición puntual, pero la dinámica de liberación de sRAGE y la modificación en la expresión de RAGE de membrana haría esperable que los valores de uno y otra se modificará en base al tiempo de duración de la fiebre. Es por esto que también se agrupa a los pacientes en base al número de días de fiebre antes del ingreso. Se observa así cómo los pacientes con menos de 7 días de fiebre presentan un valor de sRAGE mayor que aquellos con más de 7 días. Este hecho también informa sobre el paulatino descenso de esta forma, consecuencia tanto de su agotamiento por su actividad antagonista como por la disminución de su “*origen*”, la forma de membrana, resultado de un cambio en su expresión¹²⁶.

Estas diferencias no se objetivan en relación a la IFM en membrana de los PBMCs y tan sólo destacaría un mayor ratio positivo sRAGE/IFM de RAGE en monocitos en pacientes que consultaron entre el cuarto y el séptimo día de fiebre. Recordemos que este valor hablaría, al relacionar la forma soluble y la forma de membrana, del perfil antiinflamatorio del eje RAGE en ese momento puntual, lo que pudiera indicar que en este punto se produce una actividad máxima antiinflamatoria que disminuye, coincidiendo con el descenso de la forma soluble, a partir del séptimo día (Figura 30). Del algún modo este punto se podría considerar que RAGE alcanza el nivel máximo de compensación el tercer día con un descenso paulatino posterior.

Continuando con esta misma perspectiva inflamatoria, parece de interés reflexionar acerca del posible efecto que sobre el eje RAGE pudiera tener el uso de antibioterapia previa al ingreso: *¿una antibioterapia adecuada disminuye la inflamación y por lo tanto afecta a RAGE?*²,^{16, 17, 39, 136, 137}. La administración de antibioterapia se realizó en base a criterios clínicos, siendo por lo tanto probable que alguno de los pacientes tratados no padecieran una neumonía de etiología bacteriana, y por lo tanto no influyera el tratamiento recibido ni en la evolución clínica ni en la situación inflamatoria. Con intención de dilucidar esto también se realizó un análisis comparativo estratificado en función del tipo de NAC sospechada al ingreso independientemente del tratamiento previo recibido.

No existen trabajos que estudien el comportamiento eje RAGE tras la administración de antibioterapia. Los trabajos publicados que pudieran relacionarse con esto se basan exclusivamente en la modificación de los valores de la forma soluble y no hacen análisis de la posible respuesta de la forma de membrana^{106, 169}. Los artículos relacionados con la modificación de la forma membrana en función del tratamiento se han realizado en enfermedades de carácter más o menos crónico (enfermedades neurodegenerativas¹⁷⁰ o la diabetes^{40, 171}).

En nuestros pacientes no se observan diferencias en ninguna de las formas de RAGE estudiadas. La conclusión derivada de este hallazgo, el eje RAGE no se ve influido por el tratamiento antibiótico, deberá ser reevaluada en el futuro. El hecho de haber realizado este trabajo en pacientes con requerimiento de ingreso, y por lo tanto con evolución tórpida y mayor inflamación subyacente consecuencia de una no respuesta o respuesta ineficiente al tratamiento antibiótico, podría haber influido sobre los resultados. La ausencia de modificación del eje RAGE puede estar en relación con no haber mejorado a pesar del tratamiento, o con presentar una NAC de causa no bacteriana que no se beneficie del tratamiento antibacteriano pautado.

En la búsqueda de una relación entre sRAGE y el agente causal de la NAC se observa que la baja rentabilidad global de los cultivos impide un análisis certero (Anexo 1). Este obstáculo, ampliamente comentado en la literatura,^{12, 17, 19, 23} hace que para el análisis *etiología-RAGE* se agrupe a los pacientes en base al tipo de neumonía sospechada y la realización de test de diagnóstico rápido viral en urgencias^{105, 172, 173}.

El cuanto al test viral se refiere esta agrupación se realiza tomando conciencia de dos problemas metodológicos: su solicitud puede depender del criterio del clínico que realizó la asistencia y estará influido por el periodo epidemiológico en el que se produjo la consulta. Aún con esto parece de interés conocer el comportamiento del eje de RAGE en el contexto de infección viral diagnosticada. La inflamación respiratoria en esta situación difiere desde un punto de vista inmune o molecular a la acontecida en la infección bacteriana. Las infecciones virales derivan en una afectación difusa de aquella región de la anatomía susceptible a las mismas, de este modo las infecciones respiratorias producidas por virus se relacionan con inflamación del conjunto de la vía respiratoria y afectación generalmente bilateral y no localizada del parénquima pulmonar. Esto, considerando que sRAGE se ha descrito de forma constitutiva en pulmón, y dado que el insulto inflamatorio sería difuso, podría condicionar una acción de mayor entidad sobre el eje inflamatorio vinculado a esta molécula^{19, 174, 175}.

En los pacientes analizados en este trabajo se observa que aquellos en los que se realizó diagnóstico rápido viral al ingreso mostraron unos valores de sRAGE más elevados sin significación estadística (Tabla 33). Posteriormente se realiza un análisis de subgrupos entre los pacientes con test viral realizado y positivo, mostrándose de nuevo valores ligeramente superiores en los pacientes con test positivo para infección viral (Tabla 35). Este hecho ya había sido descrito por nuestro grupo en pacientes con bronquiolitis aguda grave e infección por virus respiratorio sincitial (Anexo 2)³².

Con intención de completar el análisis del papel de RAGE en las infecciones virales o con participación difusa del parénquima pulmonar se analizan sus valores en función de la imagen radiológica asociada y el tipo de neumonía sospechada al ingreso. La prueba de imagen fundamental en caso de NAC es la radiografía de tórax^{2, 17}. Dicha prueba permite localizar la región o regiones afectadas y, en ocasiones, en función de las características radiológicas objetivadas, dirigir el tratamiento empírico y establecer una sospecha diagnóstica. Mediante la prueba de imagen se obtiene una visión macroscópica del daño establecido por la inflamación subyacente¹⁹. La afectación pulmonar, será dependiente del agente causal. Del mismo modo los diversos grados de afectación vistos por imagen deberían poder relacionarse con datos analíticos en el paciente^{14, 176}.

En el momento actual no existen trabajos que evalúen o relacionen de forma directa los valores del eje RAGE con la imagen obtenida en pacientes con NAC. Si existen, tal y como se ha comentado, trabajos que en el seno de daño pulmonar objetivan variación en relación a RAGE en función no sólo del grado de afectación o infiltración celular sino también como respuesta a determinadas modificaciones en el manejo respiratorio^{34, 77, 84, 104, 177}.

En nuestro trabajo el abordaje de la posible relación del daño visto por imagen y RAGE se realiza considerando la distribución y las características radiológicas de la afectación. Ambos aspectos pueden ser puestos en relación con el agente causal y aportan información quizá diagnóstica quizá pronóstica^{3, 4, 56}.

Parece observarse, a pesar de ser bajo el número de pacientes analizados, que los casos con afectación bilateral muestran valores más elevados de sRAGE que el resto en la comparación paramétrica de los mismos (Tabla 36). Este hallazgo tendría sentido si se considera el valor de sRAGE como marcador daño pulmonar. Como ya se ha comentado el valor de sRAGE parece ser signo de afectación difusa, siendo mayor cuanto mayor es el daño^{78, 163}.

El valor más bajo obtenido en pacientes con afectación localizada se puede explicar desde dos enfoques. Por un lado la afectación pulmonar al estar circunscrita a una determinada región, compromete menos tejido y en consecuencia, traduce un sRAGE circulante más bajo. Por otro lado, y de forma complementaria, considerando el posible papel de sRAGE como elemento participe en el reclutamiento de neutrófilos, tiene sentido que los pacientes con afectación localizada, de probable causa bacteriana, al mostrar un valor de neutrófilos más elevado, se acompañen de unos niveles de sRAGE bajos dado que esta molécula se agotaría al anclarse a los neutrófilos con intención de participar en su reclutamiento pulmonar^{116, 178}.

En cuanto al RAGE de membrana celular, se observa que el ratio sRAGE/IFM de monocitos es mayor en aquellos pacientes con afectación bilateral (Figura 27). Este ratio, que ya ha mostrado significación en otros apartados de nuestro trabajo, es mayor cuanto mayor es la forma de sRAGE circulante. A pesar de que no existen datos previos en la literatura que permitan inferir el significado de este hecho, considerando la afectación bilateral como signo probable de infección atípica^{8, 16, 54}, la existencia de un ratio sRAGE/IFM de monocitos elevado podría relacionarse con una mayor presencia de sRAGE libre por parte de los pacientes con este tipo de afectación al tiempo que indica un daño difuso.

Continuando con este enfoque, esto es, el tipo de alteración radiológica podría ponerse en relación con la causa subyacente y esto a su vez con los valores del eje RAGE, se realiza una nueva estratificación en base no ya a la distribución sino a las características del daño objetivado (infiltrado, consolidación o derrame). Se observa de nuevo que el valor de sRAGE parece disminuir de manera paulatina cuanto más localizada es la afectación pulmonar (Figura 28). En trabajos previos se ha visto como en caso de infección viral o daño pulmonar difuso y grave, los valores de sRAGE tienden a mostrarse elevados^{7, 32, 77, 104}. A pesar de que no se objetivan diferencias con significación estadística parece que los pacientes con afectación local, y con probable relación con infección bacteriana y localización regional del daño, muestran unos

valores más bajos lo que se podría relacionar con una menor cantidad de tejido pulmonar afecto (menos sRAGE en sangre periférica) y mayor migración de neutrófilos a esa región (participando a su vez en una menor disponibilidad de sRAGE periférico). También el ratio sRAGE/IFM de monocitos es menor, con significación estadística, en los pacientes con consolidación y derrame pleural (Tabla 37). Estos pacientes muestran menos sRAGE circulante y menos RAGE en membrana de monocitos, lo que se puede atribuir a una situación inflamatoria diferenciada y con mayor consumo de la forma soluble.

Se estudia también el perfil del eje RAGE considerando el conjunto de los criterios utilizados para definir el tipo de NAC sospechada en la asistencia inicial de los casos reclutados. Es sabido que las características epidemiológicas asociadas a ciertos condicionantes clínico-analíticos permiten no sólo sospechar un probable agente causal, sino también dirigir el tratamiento empírico del paciente^{1, 16, 17}. En nuestro trabajo se clasificó a los pacientes en tres tipos de sospecha de NAC: NAC típica, NAC atípica o indiferenciada^{10, 12, 20}. En base a publicaciones previas, centradas sobre todo en el posible papel de sRAGE en el contexto de infección respiratoria, parecía probable observar no sólo una diferencia en el patrón del eje RAGE al comparar con los casos sino también al considerar los diferentes subgrupos creados^{92, 105, 106, 169, 172}. De este modo los pacientes con sospecha de NAC atípica o indiferenciada presentaron un valor de sRAGE mayor, sin significación estadística, que aquellos con sospecha de neumonía típica (Figura 30). Si se asume que los pacientes con criterios clínico-analíticos compatibles con NAC típica tienen mayor probabilidad de infección bacteriana (inmunidad mediada por neutrófilos) y lesiones localizadas en la radiografía^{16, 17}, es razonable obtener un resultado como el encontrado en nuestro trabajo.

Una vez evaluado el papel del eje RAGE sobre la situación previa al ingreso, los antecedentes personales, la prueba de imagen y el posible agente causal, se estudia este eje desde el punto de vista clínico-analítico. Su participación en la inflamación subyacente en caso

de NAC, debería presentar relación con los signos, síntomas y hallazgos analíticos al ingreso^{16, 17, 179}. Para su análisis se consideraron aquellos parámetros que informando sobre el grado de afectación, requieren de un abordaje específico y constituyen el motivo fundamental de ingreso hospitalario^{16, 17, 179}. Como único hallazgo de interés se observa una diferencia significativa entre los diferentes motivos de ingreso en relación al ratio sRAGE/IFM en monocitos. A este respecto resulta interesante destacar que los pacientes con hipoxemia mostraron los valores más elevados del ratio sRAGE/IFM en monocitos y sRAGE (Tabla 40). Obviamente no resulta posible obtener conclusiones de este hecho, pero quizá la hipoxemia traduzca un daño pulmonar importante y, por lo tanto, este hallazgo sea expresión de su influencia sobre el eje RAGE^{6, 77, 78}.

Considerando el hemograma al ingreso de los casos reclutados, se observa una ausencia de correlación estadística entre el número de leucocitos al ingreso y los valores de sRAGE o RAGE determinados en membrana mediante citometría. Sí parece existir correlación estadística entre el número de leucocitos y el ratio sRAGE/IFM en monocitos para RAGE, siendo esta además de carácter negativo (figura 33). Para completar el análisis de la posible relación de RAGE y sRAGE con el número de leucocitos circulantes se realiza un análisis de subgrupos (Tabla 41). Así, tras descartar por el bajo número de casos a los pacientes con menos de 5000/ μ l leucocitos, de nuevo no se observan diferencias de interés salvo en relación al ratio sRAGE/IFM en monocitos. Este ratio es mayor en aquellos pacientes con 5000-15000/ μ l leucocitos. Ya se ha comentado que el citado ratio podría relacionarse con la actividad antiinflamatoria del eje RAGE. En este caso esto podría verse desde otra perspectiva al conocer el papel de sRAGE sobre el reclutamiento de células blancas. Así tendría sentido observar que este es mayor, asociando por lo tanto una mayor disponibilidad relativa de sRAGE, cuanto menor sea el número circulante de las células causantes de inflamación en la NAC, dado que estas estarían siendo reclutadas, con la ayuda parcial de sRAGE, en el tejido pulmonar afecto por la infección.

Se pone también el foco en los neutrófilos, dado que son estos los que de forma mayoritaria dirigen la respuesta inmune del paciente ante NAC^{16, 17, 178}. El número de neutrófilos forma parte de los criterios diagnósticos de la NAC¹⁹ y constituyen un pilar en la inmunidad celular en el contexto de infección bacteriana^{166, 180}. El receptor para productos avanzados de glicosilación tiene un papel de interés sobre la migración de los neutrófilos, mostrando los valores de sRAGE y estas variaciones de sentido inverso^{116, 172, 178}. En nuestro trabajo no se encuentran datos de interés en las variables estudiadas a excepción de aquellas relacionadas con el ratio sRAGE/IFM de RAGE en monocitos (tabla 42). Este ratio resulta menor en pacientes que con más de 7500 neutrófilos/ μ l asociando valores más bajos de sRAGE y un menor ratio sRAGE/IFM de RAGE. Estos hallazgos tienen sentido biológico puesto que el neutrófilo captura y es capturado por sRAGE disminuyendo en consecuencia su disponibilidad e influyendo de forma negativa sobre el ratio^{116, 178, 181}.

En cuanto al número de plaquetas, la situación inflamatoria en el contexto de la NAC asocia frecuentemente, y en relación a la liberación de citoquinas, una elevación de estas^{117, 166, 167}. El eje RAGE parece no tener relación con este fenómeno, tal y como se comprueba en nuestro trabajo. Tan solo al agrupar los pacientes en función del número de plaquetas, aquellos con más de 500000/ μ l presentan unos valores de sRAGE superiores sin significación estadística. El estudio de esta molécula, en cuanto a su influencia sobre las plaquetas, quizá sea de interés en caso de observarse alteración en la función plaquetaria o fenómenos trombóticos dado que esto sí parece estar relacionado con el papel activatorio de sRAGE sobre ellas⁸⁸.

Con intención de conocer el valor del estudio del eje RAGE en función de biomarcadores ya disponibles, se estudia su posible relación con la proteína C reactiva, biomarcador clásico de inflamación en contexto de NAC¹¹⁹. Se observa una correlación negativa y significativa entre los valores de PCR y la IFM para RAGE en monocitos (Figura 31). Este hecho, no descrito con anterioridad en la literatura, parece indicar que aquellos pacientes con valor más elevado de

PCR agotan la forma de membrana con objeto de obtener un mayor “*potencial*” antiinflamatorio circulante. Esto, que debiera influir en los valores de sRAGE, se estudia distribuyendo los casos en dos grupos en base al punto de corte para la PCR considerado como de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección bacteriana²⁰. Se observa que, aún sin presentar significación estadística, los pacientes con una proteína C reactiva superior o igual a 8 mg/dl presentan también valores más bajos de sRAGE circulante y por lo tanto menos disponibilidad de esta molécula (Tabla 46). Probablemente esto es consecuencia de su unión a ligandos de inflamación y agotamiento consecuencia de este hecho.

Tras el análisis de todas las variables relacionadas con la NAC al ingreso y su posible relación con el eje RAGE, se estudia su relación y posible influencia sobre la evolución del paciente^{98, 173, 182}. Naturalmente no se debe considerar al eje RAGE como responsable exclusivo de este hecho que será influido por múltiples aspectos no considerados en este trabajo^{56, 166}.

El cese de la fiebre y la retirada de soporte respiratorio constituyen dos marcadores fundamentales de la evolución en todo paciente con NAC^{2, 16, 17, 29}. La fiebre se relaciona con la situación inflamatoria subyacente, y traduce información sobre cambios que desde el punto de vista molecular pueden afectar o verse influidos por RAGE. En cuanto a la necesidad de oxigenoterapia, su disminución informa no sólo de una menor inflamación sino de una disminución del daño pulmonar asociado^{54-56, 167, 182}.

En nuestro trabajo, como se puede observar en las tablas 49 y 50 no se encuentra correlación o significación estadística con las variables estudiadas en cuanto a la evolución global de los pacientes. Tampoco parece que los pacientes con ingreso en UCIP mostrarán un perfil de RAGE diferente al resto.

Con intención de estudiar de forma cualitativa, y no sólo cuantitativa, los datos obtenidos se agruparon a los pacientes en función de su distribución frente a cada una de las variables

estudiadas sin obtener tampoco ningún resultado de interés. Finalmente, con intención de confirmar la ausencia de relación estadística de las variables evolutivas analizadas, se agrupa a los pacientes en función de los valores obtenidos para cada una de las variables del eje RAGE y su distribución en base a la mediana. De esta forma se categoriza a los casos en dos grupos para el análisis. Con ello podemos observar cómo, sin presentar significación estadística, los pacientes con un valor de sRAGE menor a la mediana presenta tendencia a un mayor número de días ingreso al tiempo que asocian más días de fiebre (Tablas 52 y 53). Este hallazgo, que debe considerarse con precaución dado el bajo número de casos y el hecho de no poder atribuir a sRAGE de forma exclusiva la evolución en estos dos aspectos, podría ponerse en relación con la actividad antiinflamatoria de sRAGE.

Se observa también cómo los pacientes con un ratio sRAGE/IFM en monocitos más elevado son aquellos con un mayor tiempo de ingreso (Tabla 54). Considerando el hecho de que un valor elevado del mismo debería traducir un mayor perfil antiinflamatorio, la asociación esperable podría ser la contraria. En este punto el mayor valor de sRAGE podría relacionarse con el daño pulmonar. Así el valor del ratio sería más elevado al existir un mayor sRAGE disponible, consecuencia no tanto de su liberación desde membrana sino desde el tejido pulmonar dañado.

5. Utilidad de sRAGE e IFM de RAGE como biomarcador en contexto de NAC

La descripción de un biomarcador ideal de daño pulmonar es compleja. El receptor de productos avanzados de glicosilación supone una molécula de gran interés a este respecto. En un principio su origen eminentemente pulmonar la convierte en potencial biomarcador de este órgano. Según trabajos como el de *Bucher et al* será un biomarcador ideal aquel que participe en la patogenia de la enfermedad a estudio, asocie una relevancia clínica importante, se vea

modificado por el tratamiento y sea fácilmente determinable y repetible en diversos contextos clínicos¹⁸³. Considerando estos criterios, los hallazgos obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a la utilidad de RAGE en el contexto de NAC podrían parecer en principio escasos. El hecho de solo haber estudiado sus valores al ingreso impide probablemente realizar hallazgos concluyentes o de gran relevancia más allá de la mera descripción puntual.

A pesar de esto sí parece anticiparse el interés del eje RAGE como marcador de afectación pulmonar. En nuestro trabajo se describe por vez primera su variabilidad en función de la afectación pulmonar unilateral o bilateral vista por radiografía de tórax al ingreso (Figura 36 y Tabla 56):

1. Los ratios “sRAGE/IFM monocitos” y “sRAGE/IFM de la suma de RAGE en monocitos y linfocitos” se relacionan con una mayor afectación vista por imagen^{32, 101, 106}.
2. El valor de sRAGE es mayor cuanto más difuso es el daño pulmonar.

Ambos hallazgos, si bien no ofrecen más información útil que la misma imagen radiológica ni parecen modificar el enfoque clínico inicial en la NAC, constituyen un punto de partida de interés. El estudio de su variabilidad, ya sea en la NAC o otras enfermedades de base respiratoria, permitirá confirmar o desmentir su atractivo a este respecto además de comprobar su verdadera influencia sobre la evolución del cuadro.

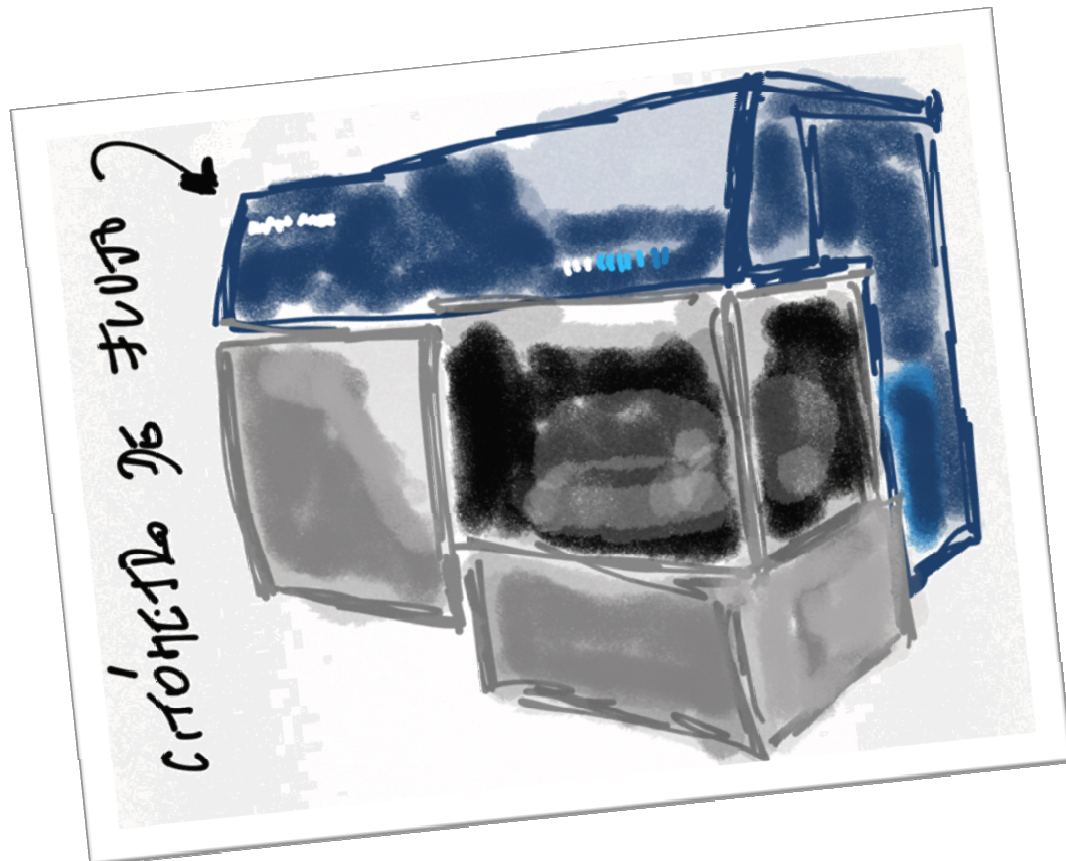
VIII. Limitaciones

Este trabajo presenta las siguientes limitaciones:

- El número de casos y controles incluidos es pequeño, si bien resulta mayor que los previamente publicados en relación a la molécula estudiada obliga a considerar los resultados con precaución.
- La edad de los casos y controles, así como el sexo de los mismos, resulta diferente de forma significativa. Si bien esto no parece influir en los resultados, obliga a considerar con precaución los resultados obtenidos en cuanto a comparación de datos.
- A pesar de ser un estudio observacional prospectivo, puesto que determinadas variables clínicas se obtuvieron de las historias de ingreso y evolución, existe ausencia de datos en determinados pacientes que si bien no influyen de forma global en los resultados limitan su interpretación.
- Se obtuvo una sola determinación tanto de sRAGE como de intensidad de fluorescencia media en los casos, este hecho se derivó fundamentalmente de la dificultad para la obtención de muestras puesto que no se realizaban extracciones específicas para el estudio. A consecuencia de esto no se pudo estudiar la dinámica del eje RAGE en estos pacientes lo que habría aportado datos de interés puesto que no ha sido explorado de forma suficiente.
- No se describen los valores de otras moléculas vinculadas al eje RAGE. Así, tras los resultados, parece de interés añadir el estudio de moléculas como esRAGE o ligandos de RAGE de membrana como HMGB1 o los productos avanzados de glicosilación o AGEs. Dichas moléculas deberán ser estudiadas como parte complementaria a este trabajo de tesis, existiendo para ello un seroteca producto de la recogida y procesamiento de muestras para este trabajo.
- La dificultad para el diagnóstico etiológico impide el análisis adecuado de la posible influencia de este aspecto en relación a los datos analizados. Se intenta paliar esto mediante la

clasificación de la NAC que motivó el ingreso en base a los datos clínico-analíticos que se utilizan en la actualidad para el inicio de antibioterapia empírica. Sin duda se deben complementar los resultados con este hecho en un futuro.

IX. Conclusiones



1. En niños sanos el valor medio de la forma soluble de RAGE es 848,98 pg/ml (± 579). El valor medio de IFM de RAGE para monocitos es 1382,21 (± 506) y para linfocitos es 792,02 (± 90). Observamos que el incremento de la forma libre en plasma se asocia al descenso de la forma de membrana en linfocitos ($r=-0,304$, $p=0,048$). Además la presencia de RAGE en membrana en este tipo celular aumenta con la edad ($r=0,402$, $p=0.008$).

2. El valor medio de la forma soluble de RAGE en niños con neumonía adquirida en la comunidad es de 650,96 pg/ml ($\pm 558,1$). El valor de IFM de RAGE para monocitos es de 126,04 ($\pm 269,4$) y para linfocitos es de 53,22 ($\pm 99,65$).

3. Los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad e ingreso hospitalario presentan un descenso en el valor medio tanto de la forma soluble de RAGE ($p=0,008$) como del RAGE de membrana en monocitos y linfocitos ($p=0,000$ en ambos casos).

4. Los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad que presentan un ratio más elevado de sRAGE/IFM de RAGE en monocitos son aquellos que consultan entre el cuarto y séptimo día de fiebre ($p=0,014$). Además este grupo de pacientes asocian afectación bilateral ($p=0,001$), infiltrados en la radiografía de tórax ($p=0,026$) e hipoxemia ($p=0,037$).

5. En el paciente con neumonía adquirida en la comunidad el número de leucocitos al ingreso disminuye cuanto mayor son los ratios sRAGE/IFM de RAGE del conjunto monocitos-linfocitos ($p=0,44$; $r=-0,28$) y sRAGE/IFM en monocitos ($p=0,01$; $r=-0,47$).

6. El ratio sRAGE/IFM de monocitos es menor en pacientes con más de 15000 leucocitos/ μ l ($p=0,034$) y disminuye cuanto mayor es el número de neutrófilos totales ($p=0,03$; $r=-0,41$).

7. La presencia de RAGE en la superficie de monocitos se ve disminuida cuanto mayor es la proteína C reactiva al ingreso ($p=0,036$; $r=-0,288$).

8. La afectación pulmonar bilateral objetivada en la radiografía de tórax de ingreso puede ser anticipada en función del valor de los ratios sRAGE/IFM de RAGE en monocitos (valor

superior a 3,9, $p=0,015$) y sRAGE/IFM de la suma de RAGE en linfocitos-monocitos (valor superior a 2,29, $p=0,015$).

9. Un valor elevado del ratio de sRAGE/IFM de RAGE se asocia a un mayor número de días de ingreso hospitalario (valor superior a 2,59, $p=0,029$).

10. A excepción del ratio sRAGE/IFM en linfocitos, todos los ratios estudiados para el eje RAGE se elevan en caso de neumonía al comparar con el control sano.

X. Anexos

1. Anexo 1

1. Descripción clínico-evolutiva de los casos

En el periodo de estudio, noviembre 2012 - enero de 2014, se reclutaron 63 casos. En el estudio estadístico descriptivo se incluyen aquellos pacientes que presentaran valores obtenidos de la misma muestra para sRAGE e inmunofluorescencia de RAGE mediante citometría de flujo. En la figura A1 se describe mediante un diagrama de flujo los casos incluidos.

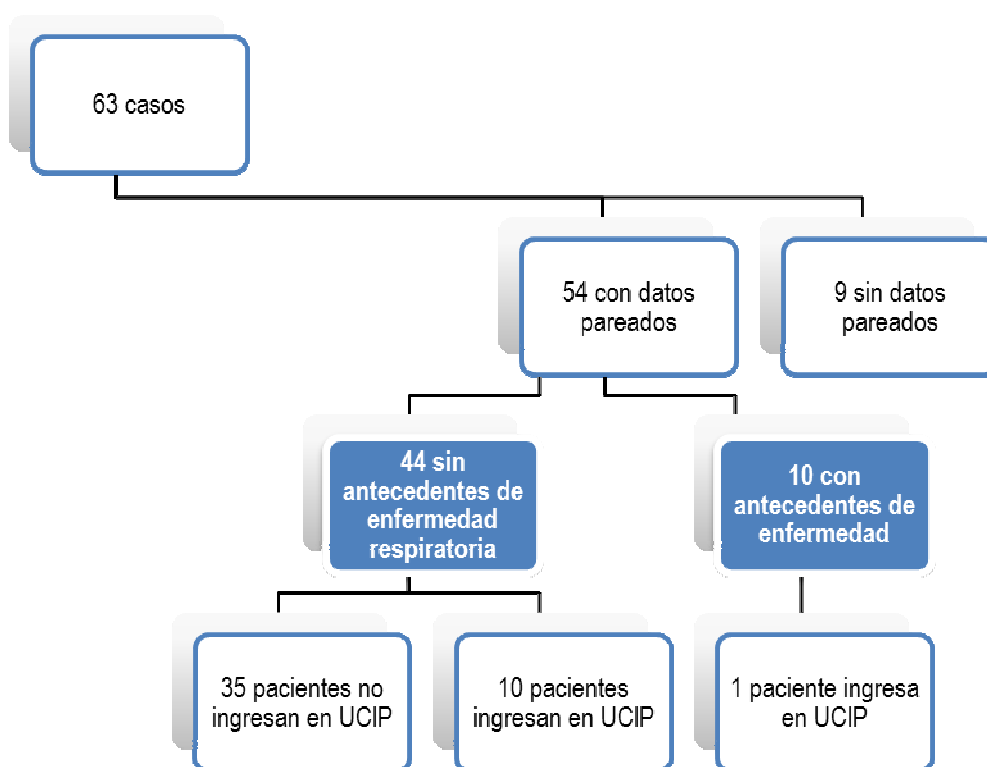


Figura A1. Casos reclutados para este trabajo, se indica con fondo azul los casos que han sido incluidos en el análisis estadístico.

1.1 Epidemiología

Se reclutaron 54 casos, 30 mujeres y 24 varones con una edad media de 33 meses (rango 2 -132 meses, mediana de 26 y DS± 25,1) o 2,7 años (rango 0 – 11 años, mediana de 2, DS± 2.1). En la tabla A1 se muestra distribución por grupos de edad:

	Frecuencia	Porcentaje
Hasta 3 años	34	63,6%
4 - 7 años	18	32,7%
8 - 12 años	2	3,6%

Tabla A1. Distribución de los casos por grupos de edad.

Considerando la distribución por años 41 pacientes se incluyeron durante el 2013, 12 durante el 2012 y 1 durante el 2014. Se adjunta en la figura A2 la distribución por meses.

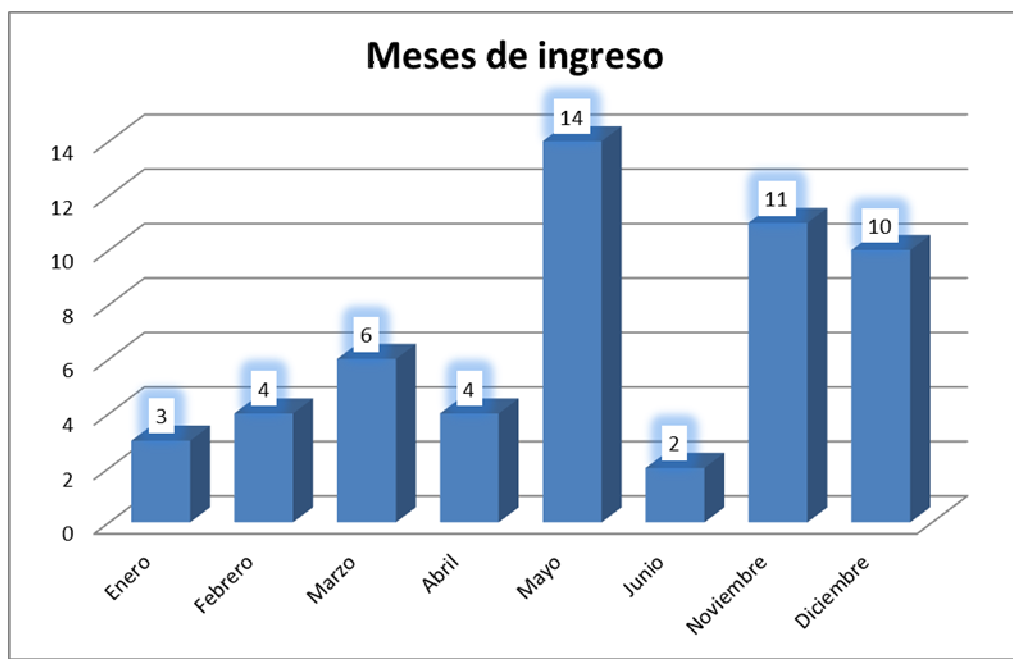


Figura A2. Distribución por meses, en base al ingreso por neumonía, de los casos incluidos en el estudio.

1.2 Antecedentes personales y vacunación

Considerando los antecedentes personales 9/54 habían presentado de forma previa a su inclusión en el estudio una neumonía diagnosticada por un médico; de ellos 8/9 requirieron el ingreso hospitalario durante la evolución de la misma.

Por otro lado 10/54 casos presentaban antecedentes de enfermedad (ver tabla A2) habiendo sido previamente diagnosticados de neumonía 2/10 requiriendo ingreso hospitalario en ambos casos para el tratamiento (paciente con enfermedad respiratoria asmática y paciente con enfermedad respiratoria de causa neurológica):

	Frecuencia
Anemia a estudio	1
Neuromuscular	2
Oncohematológica	1
Prematuro	3
Respiratoria	2
Respiratoria, Neurológica	1

Tabla A2. Enfermedad de base de 10 de los casos incluidos en el estudio.

Ninguno de los casos incluidos presentó antecedentes de alergia. Todos ellos, a excepción de un caso, habían recibido las vacunas incluidas en el calendario de su comunidad autónoma. En relación a la vacuna heptavalente frente al neumococo 3/54 no habían sido vacunados.

1.3 Anamnesis

La media de días naturales con temperatura superior a 38°C hasta la consulta fue de 3,85 (rango 0 – 15 días, mediana 3 y DS± 3,5); 16/54 habían recibido tratamiento antibiótico de forma previa al ingreso. Los fármacos pautados se indican en la siguiente tabla:

	Frecuencia
No reciben antibiótico	38
Amoxicilina	10
Amoxicilina-clavulánico	1
Cefuroxima-Axetilo	4
Otros	1

Tabla A3. Antibiótico pautado de forma previa al ingreso.

Se determinó si el antibiótico administrado de forma empírica se había pautado a la dosis adecuada en base a las indicaciones terapéuticas de la guía de terapia antimicrobiana de nuestro centro (ver tabla 4). De este modo 3/14 recibieron una dosis inferior de la recomendada para el antibiótico pautado.

1.4 Hemograma y reactantes de fase aguda

Se describen a continuación en la siguiente tabla los parámetros relativos al hemograma y reactantes de fase aguda obtenidos en la extracción analítica previa al ingreso:

	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Leucocitos / μ l	54	14455	12170	36010	3250
Neutrófilos / μ l	54	9990	7490	29000	2080
Plaquetas / μ l	54	355623	321000	865000	113000
Hemoglobina mg/dl	54	11,71	11,85	15,40	,00
PCR mg/dl	54	8,90	4,10	39,00	,50
PCT ng/ml	54	1	0	23	0

Tabla A4. Valores de hemograma y reactantes de fase aguda en los casos incluidos en el trabajo.

Se describen en las tablas A5 y A6 los mismos valores distribuyéndose los casos en función de la existencia o no de enfermedad de base:

	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Leucocitos / μ l	44	15158	12670	36010	4770
Neutrófilos / μ l	44	10395	8140	29000	2100
Plaquetas / μ l	44	372953	332000	865000	165000
Hemoglobina mg/dl	44	11,53	11,75	15,40	,00
PCR mg/dl	44	9,10	4,10	39,00	,50
PCT ng/ml	44	1	0	23	0

Tabla A5. Valores de hemograma y reactantes de fase aguda en los casos sin enfermedad de base incluidos en el trabajo.

	Recuento	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Leucocitos / μ l	10	11431	11550	19360	3250
Neutrófilos / μ l	10	8249	6205	15720	2080
Plaquetas / μ l	10	281100	291000	401000	113000
Hemoglobina mg/dl	10	12,50	12,65	15,00	10,00
PCR mg/dl	10	8,04	6,55	19,90	,80
PCT ng/ml	10	1	0	8	0

Tabla A6. Valores de hemograma y reactantes de fase aguda en los casos con enfermedad de base incluidos en el trabajo.

1.5 Radiografía de tórax

Se realizó radiografía de tórax en 53/54 casos. La observación radiológica más prevalente, según el informe escrito por el especialista, fue la consolidación unilateral (22/54). En la siguiente tabla se resumen los hallazgos radiológicos en los casos analizados:

	Frecuencia
No registrado	1
Consolidación bilateral	2
Consolidación unilateral	22
Derrame pleural unilateral	6
Hecha y normal	2
Infiltrados bilaterales	12
Infiltrados unilateral	9

Tabla A7. Hallazgos radiológicos en los pacientes incluidos en el estudio.

En los pacientes sin enfermedad de base se objetivó una consolidación unilateral en 18/44 y en aquellos con antecedentes de enfermedad en 4/10. Reagrupando los resultados de la radiografía en función de la presencia de consolidación, infiltrado o derrame pleural se observa la siguiente distribución:

Pacientes incluidos en el estudio			
Consolidación	Derrame	Normal	Infiltrado
24	6	2	21

Tabla A8. Hallazgos radiológicos en los pacientes incluidos en el estudio.

En los pacientes sin enfermedad de base 20/44 presentaron consolidación y 16/44 infiltrado; en los pacientes con enfermedad de base 5/10 presentaron consolidación y 4/10 infiltrado. En cuanto a la afectación unilateral o bilateral según el informe del radiólogo 14/54

presentaron afectación bilateral y 37/54 unilateral. Los pacientes previamente sanos 30/44 mostraron afectación unilateral y 11/44 afectación bilateral. Los pacientes con antecedentes personales de enfermedad 3/10 mostraron signos radiológicos de afectación bilateral y 7/10 afectación unilateral.

1. 6 Ecografía de tórax

Se realizó ecografía torácica en 7/54 pacientes; 2/7 mostraron un derrame pleural drenable al ingreso, 1/7 derrame pleural bilateral no drenable y 4/7 derrame pleural unilateral drenable. Las ecografías sólo se realizaron en pacientes sin antecedentes de enfermedad.

1.7 Diagnóstico etiológico al ingreso

Se realizó el test para diagnóstico de infección viral mediante técnica rápida en aspirado nasofaríngeo en 32/54 pacientes; en 9/32 fue positivo para virus respiratoria sincitial (VRS) y en 23/32 negativo.

Considerando el grupo de pacientes sin AP de enfermedad este test se realizó en 25/44 siendo positivo en 5 casos para VRS. En el grupo de pacientes con AP de enfermedad se realizó en 7/10 siendo positivo en 4 casos para VRS. Los pacientes con test positivo para VRS se reclutaron 6/9 en los meses de diciembre y 3/9 en los meses de noviembre.

1.8 Motivo de ingreso

Se recoge como causa fundamental de ingreso la presencia de hipoxemia y dificultad respiratoria asociada (21/54). En la tabla A9 se describen las diferentes causas de ingreso recogidas en el trabajo:

	Frecuencia
Dificultad respiratoria e hipoxemia	21
Dificultad respiratoria	20
Hipoxemia	2
No registrado en la historia	3
Otros: malestar general, no tolerancia oral o enfermedad de base.	8

Tabla A9. Causa fundamental de ingreso en los pacientes incluidos en el estudio.

Considerando la presencia o no de enfermedad de base previa al ingreso por neumonía obtenemos la siguiente distribución (Tabla A10):

	Sin enfermedad de base	Con enfermedad de base
Dificultad respiratoria e hipoxemia	18	3
Dificultad respiratoria	14	6
Hipoxemia	2	0
No registrado	3	0
Otro	7	1

Tabla A10. Causa fundamental de ingreso en los pacientes en función de la presencia de enfermedad de base.

1.9 Tipo de neumonía al ingreso

Aplicando los criterios indicados en la tabla 1 se diagnosticaron como típicas 34/54, 5/54 atípicas y 14/54 atípicas. Los pacientes sin enfermedad de base presentaron 29/44 una neumonía atípica. En el grupo de pacientes con enfermedad previa 5/10 fueron neumonías típicas y 5/10 indiferenciadas.

1.10 Antibiótico pautado al ingreso

Se indica a continuación el antibiótico pautado al ingreso (Tabla A11):

	Frecuencia
Amoxicilina-clavulánico	1
Ampicilina	41
Beta-lactámico + clindamicina	1
Beta-lactámico + macrólido	1
Cefotaxima	4
Ingresa sin antibiótico	2
Macrólido	3
Penicilina	1

Tabla A11. Antibiótico pautado al ingreso en los pacientes incluidos en el estudio.

En los 34/44 pacientes sin enfermedad de base se pautó ampicilina de forma empírica, en el grupo de pacientes con enfermedad de base este antibiótico también fue el de elección en 7/10.

1.11 Análisis clínico-evolutivo durante el ingreso hospitalario

Se describe en la tabla A12 la evolución global durante el ingreso en cuanto a días naturales con fiebre, días con oxígeno y días de ingreso se refiere:

	Recuento	Media	Máximo	Mediana	Mínimo
Días naturales con fiebre en planta	54	4	29	1	0
Días naturales con oxígeno en planta	54	5	48	4	0
Días ingresado	54	9	58	6	3

Tabla A12. Evolución global del ingreso en los pacientes incluidos en el estudio.

Se describen los mismos datos en los pacientes sin enfermedad de base (Tabla A13) y con antecedentes de esto (Tabla A14):

	Recuento	Media	Máximo	Mediana	Mínimo
Días naturales con fiebre en planta	44	4	29	2	0
Días naturales con oxígeno en planta	44	6	48	3	0
Días ingresado	44	9	58	6	3

Tabla A13. Evolución global del ingreso en los pacientes sin enfermedad de base.

	Recuento	Media	Máximo	Mediana	Mínimo
Días naturales con fiebre en planta	10	2	4	1	1
Días naturales con oxígeno en planta	10	4	8	4	1
Días ingresado	10	7	15	6	3

Tabla A14. Evolución global del ingreso en los pacientes con enfermedad de base incluidos en el estudio.

1.12 Antibioterapia durante el ingreso

Durante el ingreso hospitalario en 8/54 casos se realizó cambio de antibioterapia durante su estancia en planta; 6 mujeres y 2 varones siendo 7/8 sanos previamente (1 con enfermedad neurológica), sin alergias y vacunados. De ellos 3/5 habían presentado ingresos previos por neumonía. La edad media era de 26,7 meses (rango 9 - 54 meses, mediana 22 y DS± 17,2) o 2,2 años (rango 1 – 5 años, mediana 2 y DS± 1,4).

La dificultad respiratoria sola (3/8) o asociada a hipoxemia (2/8) fueron las causas de ingreso. Mostraban datos compatibles con neumonía típica 6/8 con hallazgos en la radiografía de consolidación en 6/8 (5/8 mostraron consolidación unilateral). Al ingreso se descartó infección viral en 3/8 y 1/8 presentó VRS positivo, en los 4 restantes no se realizó el test para diagnóstico viral al no encontrarse en época epidémica. Se obtuvo hemocultivo positivo en dos pacientes (se informó como contaminación por *Staphylococcus sp coagulasa negativo*) y un paciente fue diagnosticado de tuberculosis.

Se describen a continuación los datos en cuanto a días naturales con fiebre, días con oxígeno y días de ingreso se refiere (Tabla A15):

	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Días naturales con fiebre en planta	5	4	14	1
Días naturales con oxígeno en planta	6	4	14	1
Días ingresado	12	10	25	4

Tabla A15. Evolución global del ingreso en los pacientes con cambio de antibioterapia.

De los 8 casos que requirieron cambio de antibioterapia, 2 ingresaron en UCIP. En la siguiente tabla se describe la causa de ingreso y otros datos de interés (Tabla A16):

	Motivo de ingreso	Drenaje pleural	Antibioterapia iniciada	Días de ingreso en UCIP	Días de ingreso hospitalario
Caso 1	Dificultad respiratoria, derrame drenable y empeoramiento radiológico	Sí	Cefotaxima	5	25
Caso 2	Dificultad respiratoria, Sepsis clínica e hipoxemia	No	Meropenem + vancomicina	4	16

Tabla A16. Pacientes con cambio de antibioterapia e ingreso en UCIP.

El caso 1 presentó un test para antígeno de neumococo positivo en líquido pleural. El cultivo del citado líquido fue posteriormente positivo para neumococo, a su vez presentó hemocultivo positivo para *Staphylococcus sp coagulasa negativo* que se interpretó como contaminante.

2. Casos con ingreso en UCIP

Se requiere ingreso en UCIP en 11/54 de los casos reclutados; de estos 10/11 no presentaban enfermedad de base previa y sólo 1/11 se ingresó directamente desde urgencias por dificultad respiratoria. Se indica el motivo de ingreso en UCIP en la figura A3.

Motivo del ingreso en UCIP

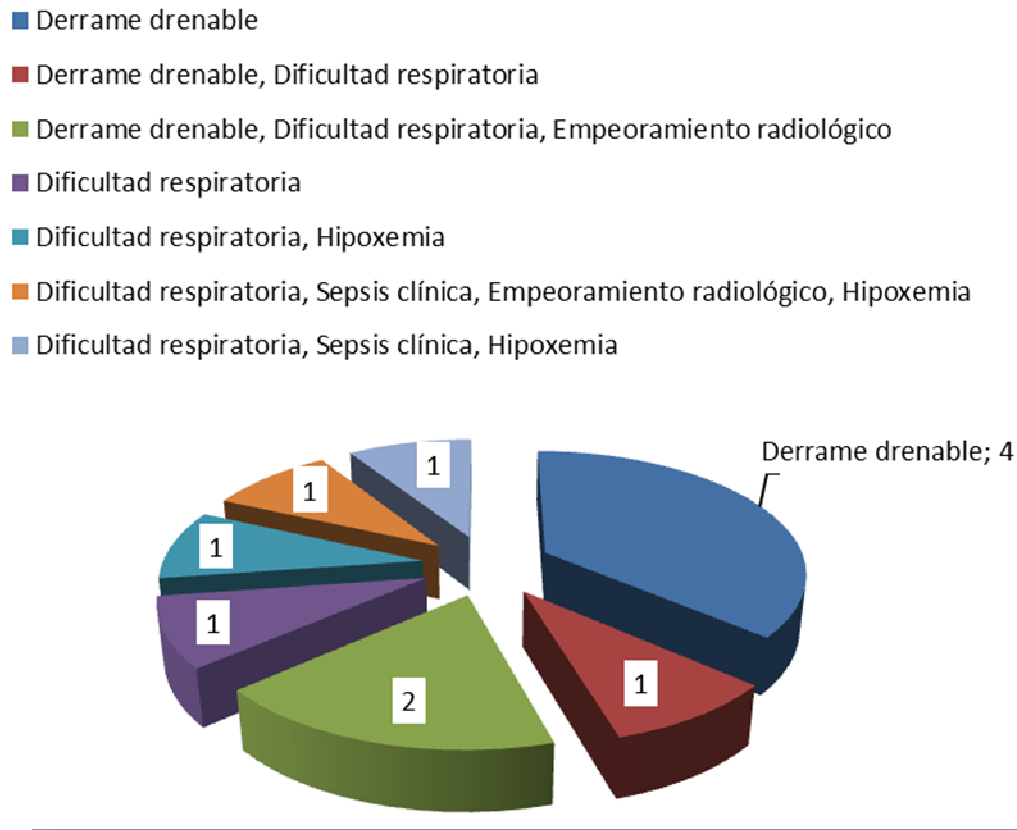


Figura A3. Causa de ingreso en UCIP.

2.1 Diagnóstico etiológico

Tan sólo en 5/54 casos se obtuvo un hemocultivo positivo. En 3/54 se consideraron contaminantes, aislándose en un paciente *Haemophilus sp* y en otro *Streptococcus pneumoniae* en hemocultivo. El paciente con hemocultivo positivo para neumococo requirió ingreso en UCIP.

2.2 Análisis descriptivo

Ingresaron en UCIP 11/54 pacientes, 4 en 2012 y 7 en 2013. Un caso mostró antecedentes personales de interés (prematuridad) y sólo un paciente se ingresó directamente desde el servicio de urgencias.

Se reclutaron 7 mujeres y 5 varones con edad media de 30 meses (rango 13 - 74 meses, mediana 24 y DS \pm 18) o 2,5 años (rango 1 – 6 años, mediana 2 y DS \pm 1,5). Todos se encontraban vacunados, incluido el neumococo, y no presentaban antecedentes de alergia. Ninguno había presentado neumonías con anterioridad. Se había indicado con anterioridad antibiótico en 4/11 estando pautado a dosis adecuadas según la guía terapéutica de nuestro centro (Tabla 4) en sólo uno de ellos (2/11 amoxicilina, 1/11 cefuroxima-axetilo y 1/11 antibiótico no betalactámico).

En relación a los días naturales con fiebre de forma previa al ingreso hospitalario la media fue de 5,1 días (rango 0 - 14 días, mediana 4 y DS \pm 4). La distribución considerando el mes de ingreso fue la siguiente: 4/11 noviembre, 2/11 abril, 2/11 marzo, 2/11 diciembre y 1/11 mayo.

En 2/11 pacientes se obtuvo un resultado positivo para VRS al ingreso desde urgencias. En relación al hemograma y reactantes de fase aguda al ingreso se describen a continuación los resultados (Tabla A17):

	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Leucocitos / μ l	15107	14350	27600	4770
Neutrófilos / μ l	9229	9050	18810	2100
Plaquetas / μ l	336455	289000	695000	155000
Hemoglobina mg/dl	10,85	10,50	12,60	9,80
PCR mg/dl	9,48	3,40	34,20	,50
PCT ng/ml	0	0	1	0

Tabla A17. Valores de hemograma y reactantes de fase aguda en los casos con ingreso en UCIP incluidos en el trabajo.

En la radiografía de tórax se informaron los siguientes hallazgos, así se observó afectación unilateral en 8/11 casos (Tabla A18):

	Frecuencia
Consolidación unilateral	4
Derrame pleural unilateral	3
Infiltrados bilaterales	3
Infiltrados unilateral	1

Tabla A18. Afectación radiológica al ingreso de los casos con ingreso en UCIP incluidos en el trabajo.

Considerando los hallazgos clínicos, analíticos y radiológicos 9/11 de los casos se interpretaron como neumonías típicas, 1/11 como atípicas y 1/11 como indiferenciadas. El motivo de ingreso fue dificultad respiratoria e hipoxemia en 8/11 y dificultad respiratoria aislada en 1/11.

El tratamiento antibiótico pautado al ingreso en el hospital fue ampicilina en 8/11 casos, cefotaxima en 2/11 y ampicilina asociada a macrólido en un caso.

La fiebre se mantuvo hasta el ingreso en UCIP en 10/11. El tratamiento antibiótico se cambió al ingresar en la UCIP en 10/11, resumiéndose el cambio en la siguiente tabla A19:

		Frecuencia
Antibiótico inicial cambiado por...	No cambiado	1
	Cefotaxima	7
	Clindamicina + vancomicina + ciprofloxacino	1
	Meropenem + vancomicina	1
	Se añade claritromicina	1

Tabla A19. Antibiótico por el que se cambió el recibido en planta de pediatría al ingresar en UCIP.

Los casos que requirieron ingreso en UCIP presentaron la siguiente evolución hospitalaria (Tabla A20):

	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Días naturales con fiebre en planta	10	7	29	1
Días naturales con oxígeno en planta	14	9	48	3
Días en UCIP	6	5	15	3
Días de ingreso hospitalario	20	16	58	6

Tabla A20. Evolución global de los pacientes con ingreso en UCIP.

Se realizó drenaje pleural en 7/11 pacientes, todos ellos vacunados frente a neumococo y con diagnóstico al ingreso de neumonía típica y negatividad en las pruebas rápidas de detección de antígeno viral si se realizó. Una vez realizado el drenaje el líquido extraído mostró características de empiema en 4/7, exudado en 2/7 y trasudado en 1/7.

La detección cualitativa mediante BinaxNow® del antígeno para neumococo fue positivo para 5/7 pacientes siendo en 1/5 el cultivo de líquido pleural también positivo para neumoco.

Al insertar el drenaje pleural presentaban tabiques visualizados por ecografía 4/7 pacientes. Se utilizó uroquinasa los 7 casos, en aquellos que no presentaron tabiques pacientes se administró una sola dosis. De forma global requirieron una media de 2,4 dosis (rango 1 - 6, DS± 1,9), ningún paciente precisó tratamiento quirúrgico posteriormente.

Considerando otros datos clínicos los pacientes que requirieron drenaje pleural no mostraron alteraciones neurológicas o metabólico-renales durante el ingreso. Dos pacientes necesitaron expansión de volemia al ingreso con suero salino fisiológico y 10/11 recibieron soporte respiratorio máximo con alto flujo mediante gafas nasales.

Se obtuvo hemocultivo positivo en 3/11 pacientes, dos de ellos fueron contaminantes y uno fue un neumococo. Este último requirió drenaje pleural y presentó Binax® positivo con cultivo de líquido pleural positivo.

3. Comentario clínico sobre los casos

3.1 Características epidemiológicas y evolutivas

En nuestra serie se reclutan 63 casos en los cuales es posible realizar citometría de flujo de sangre periférica al ingreso en 54. Se incluyen así 30 mujeres y 24 varones con una mediana de edad inferior a los controles recogidos. El número de casos reclutados se ve influido por la dificultad para la obtención de muestras para la realización del estudio pareado de citometría y ELISA.

La mayoría de los casos se reclutan en el periodo de noviembre 2011 a febrero de 2014 (28/54). Esto se puede considerar esperable dada la epidemiología habitual en pediatría de la NAC y otras infecciones respiratorias vinculadas^{1, 175} dado que las mismas muestran una mayor incidencia en los meses de invierno^{176, 179, 184}. Tan sólo 9 pacientes presentaban antecedentes personales de neumonía y sólo 10/54 mostraron antecedentes de enfermedad de cualquier otra índole.

En relación a la presencia de neumonía previa, este dato se recopiló con intención de objetivar si los pacientes con este antecedente pudieran presentar un patrón de sRAGE o IFM de RAGE diferente al resto de casos. Dicho patrón no incluye en su recogida el tiempo transcurrido desde el diagnóstico, algo que en futuros trabajos sí debiera ser considerado puesto que la presencia de RAGE en membrana, y por ende, su forma soluble, podrían ver modificada de forma variable en función del cuadro inflamatorio subyacente y la evolución del mismo^{33, 105}. Tal es así que esta dinámica ha sido demostrada en relación a la forma soluble, mostrando concentraciones variables en cortos periodos de tiempo, en otros contextos de daño pulmonar^{77, 92, 104}.

A su vez se recogió la presencia de enfermedad de base en los pacientes analizados^{94, 150}. Este dato se recopiló con la misma intención clínica que la comentada anteriormente, para determinar si la presencia subyacente de una enfermedad previa podría influir sobre los hallazgos en las formas de RAGE y sRAGE analizadas^{38, 84, 126, 131}. Como se puede comprobar en la tabla A2, y considerando aquellos en los que el insulto sobre el tejido pulmonar pudiera haber modificado los valores de RAGE^{112, 185, 186}, tan sólo cinco pacientes serían de interés real dada la posible afectación pulmonar previa³³.

3.2 Consulta hospitalaria y tratamiento antibiótico

En nuestro grupo de pacientes se produce la consulta hospitalaria transcurridos una mediana de tres días desde el inicio de la fiebre, algo ya indicado en valores semejantes en trabajos previos^{15, 56, 166, 179, 184, 187, 188}. En 16/54 pacientes se administró de forma previa al ingreso antibiótico, siendo adecuado, en cuanto a espectro se refiere en todos ellos, y en cuanto a dosis en 50/54². En este punto la difusión de guías clínicas y protocolización del tratamiento ante sospecha de NAC ha permitido no sólo una adecuada antibioterapia empírica sino también la restricción del uso indiscriminado de antimicrobianos en aras de una mayor efectividad de los mismos^{1, 2}.

3.3 Hemograma y reactantes de fase aguda

La inflamación subyacente en una neumonía¹⁶⁶, tanto a nivel regional en tejido pulmonar como a nivel sistémico, podría influir o verse influida por el perfil activatorio del eje RAGE. Así el análisis de la posible relación de RAGE con los datos analíticos que habitualmente son estudiados en este contexto resulta de interés^{19, 119, 166, 180}. Como ya se ha comentado, la presencia de RAGE en diversos tejidos del organismo, presentando de forma constante expresión en el territorio pulmonar^{43, 84}. En las tablas A4-A6 de la sección de resultados se describen los valores de diversas formas celulares y reactantes de fase aguda en los casos reclutados. La inclusión de plaquetas se realiza como consecuencia de publicaciones que relacionan, dada la ubicuidad de la molécula de RAGE, los valores de estas con modificaciones en su forma soluble⁹⁷. Se debe destacar que los hallazgos obtenidos en cuanto a número de leucocitos totales, considerando la mediana, no superan siempre el considerado como leucocitosis en contexto infeccioso. Algo que no ocurre en relación a los neutrófilos, que sí parecen presentar un valor más próximo a lo esperado en contexto de NAC con requerimiento de ingreso hospitalario. Se destaca es hecho, el número de células blancas circulantes, puesto que su elevación en contexto infeccioso constituye un signo inequívoco no sólo de activación inmune,

sino también de inflamación. Desde esta perspectiva su variación numérica también podría mostrar relación con el estado activatorio del eje RAGE a estudio^{19, 166, 178, 180}.

3.4 Pruebas de imagen

Se realizó radiografía de tórax en la práctica totalidad de los paciente incluidos en el trabajo, se observa que tanto la consolidación unilateral como los infiltrados bilaterales fueron los hallazgos más frecuentes (tabla A7). El objeto de recoger este aspecto se basa en la posible modificación de los valores de forma soluble de RAGE en base al parénquima pulmonar afectado^{6, 123}. Si bien no resulta posible estimar el porcentaje o “cantidad” de tejido afectado en cada paciente estudiado, conocer el territorio pulmonar afecto visto por radiografía y su probable correlación con los valores de sRAGE o IFM de RAGE podría aportar datos de interés a este respecto. Puesto que los datos referentes a esta prueba de imagen se recogieron del informe redactado por el radiólogo, siendo estos variables en redacción y consideraciones, se agrupa también a los casos, con intención de conocer el grado de afectación en base a la extensión radiológica, en afectación unilateral o bilateral. Se observa que 37/54 presentaron afectación unilateral. Este hecho fue el predominante tanto en pacientes sin antecedentes de enfermedad (30/44) como con con antecedentes (7/10), algo que puede tener influencia sobre el perfil activatorio en el eje RAGE de los pacientes analizados^{19, 92, 189, 190}. En sólo siete pacientes se realizó una ecografía torácica al ingreso. Este hecho, vinculado a la presencia de derrame pleural visualizado en la radiografía de tórax^{2, 5, 187}, se asocia a mayor inflamación basal y también podría verse influido con el eje RAGE.

3.5 Diagnóstico etiológico en urgencias

La etiología de la NAC en pediatría se encuentra descrita y revisada con amplitud en la literatura^{19, 76}. En la misma influyen tanto la propia edad del paciente, siendo las causas víricas las más prevalentes en los pacientes de menos de dos años, como el periodo estacional y epidémico en el que se produzcan⁷⁶. El desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido, como son

aquellas relacionadas con la detección de virus respiratorio sincitial (VRS) o virus influenza, permiten conocer la etiología de forma precoz orientando el diagnóstico y evitando tratamiento innecesarios^{19, 174, 184}. En el caso de los pacientes reclutados el conocimiento de este hecho es de especial interés, puesto que el agente causante de la NAC y la inflamación y respuesta inmune desencadenada por el mismo, pueden influir, y por lo tanto asociar un patrón de inmunofluorescencia distinto, en los valores de RAGE membrana y sRAGE^{92, 105, 172}. Se observa el empleo de técnicas rápidas de diagnóstico viral en 32 pacientes siendo positivas para VRS en tan sólo nueve de ellos.

3.6 Motivo de ingreso

La dificultad respiratoria, asociada o no a hipoxemia, fue la causa fundamental de ingreso en los pacientes reclutados. Este hecho se repite independientemente de la presencia o no de antecedentes de enfermedad pulmonar.

3.7 Tipo de neumonía al ingreso y antibioterapia

El tratamiento empírico de la NAC se realiza en base a una serie de criterios clínicos y analíticos ya descritos en la introducción de este trabajo. De este modo, la consideración de la NAC como típica, indiferenciada o atípica permitirá al clínico realizar un tratamiento adecuado y dirigido en la medida de lo posible². Los criterios utilizados para este hecho traducen de algún modo la inflamación, y por lo tanto, pueden influir sobre los valores de RAGE estudiados en este trabajo. Así el grupo más numeroso de neumonías incluidas fue el de típicas (34/54) sospechándose en consecuencia una infección bacteriana e iniciándose tratamiento antibiótico empírico^{1, 2, 19, 184}. No existen en la actualidad publicaciones vinculadas a la NAC en pediatría que describan cómo este hecho pudiera influir sobre RAGE y su forma soluble, siendo por lo tanto esto analizado con posterioridad.

3.8 Evolución durante el ingreso hospitalario

Dada la posible influencia del eje RAGE sobre la inflamación desencadenada en caso de NAC, y con intención de conocer la influencia de ésta sobre la evolución una vez se ha ingresado el paciente, se recogieron durante el mismo variables relacionadas tanto con la situación inflamatoria global de los casos (fiebre) como con la posible afectación respiratoria relacionada (días de oxigenoterapia)^{101, 136-138, 158, 164, 166, 191}. Los datos obtenidos se describen en las tablas A12, A13 y A14. A su vez se estudiaron estas variables en aquellos pacientes en los que se decidió cambiar la antibioterapia durante el tratamiento comprobándose, tal y como era esperable, tanto un mayor número de días con fiebre como de oxigenoterapia (tabla A14).

3.9 Ingreso en UCIP

Del total de pacientes reclutados once precisaron ingreso en UCIP (mediana de edad de 30 meses). Sólo uno de ellos el que ingresó directamente desde la urgencia. La necesidad de ingreso en UCIP por NAC complicada en niños es infrecuente^{1, 2, 19, 184}, estando relacionado en nuestro centro con la necesidad de drenaje de derrame paraneumónico o empeoramiento respiratorio. Puesto que se trata de pacientes que o bien al ingreso o con la evolución presentarán empeoramiento el papel de RAGE y su forma soluble podría ser de interés en cuanto a la anticipación de complicaciones.

Tan sólo uno de los pacientes que requirió ingreso en UCIP presentaba antecedentes de interés (prematuridad) y en cuatro de ellos se había empezado antibioterapia de forma previa a su visita a urgencias. La mediana de días con fiebre fue de cuatro aislándose en dos de ellos, mediante técnica rápida de diagnóstico, VRS en secreciones respiratorias.

La forma de afectación del parénquima pulmonar, visualizada mediante radiografía de tórax, fue la unilateral ya sea en forma de consolidación o derrame pleural (ver tabla A18). Al ingreso, más allá de que todos ellos recibieron antibioterapia, se clasificaron como típicas nueve

de los once pacientes, siendo la causa fundamental del mismo la dificultad respiratoria e hipoxemia. Ambos hechos, tanto la afectación radiológica como la consideración de las neumonías típicas, se puede poner en contexto con la probable etiología bacteriana de las mismas^{1, 2, 19, 184}, algo que en nuestro trabajo no se puede demostrar ante la baja rentabilidad de los estudios para el diagnóstico etiológico realizados.

A su ingreso en UCIP se realizó cambio de antibioterapia en diez casos (tabla A19) observándose en todos ellos un mayor número de días de fiebre, oxigenoterapia en planta y días de ingreso hospitalario. De los pacientes que requieren ingreso en UCIP siete de ellos precisaron drenaje pleural, ninguno de ellos mostró positividad en las pruebas de diagnóstico viral rápido. En cinco de los siete pacientes con drenaje pleural se observó positividad para el antígeno de neumococo en líquido pleural, lo cual permite concluir que el neumococo, sin conocer serotipo, fue la causa más frecuente de neumonía con derrame pleural e ingreso en UCIP². A destacar que todos los pacientes que requieren ingreso en UCIP se encontraban vacunados frente a neumococo. El fracaso vacunal aún se encuentra en estudio habiéndose incluido nuevos serotipos en las nuevas vacunas con la intención de minimizar este problema y capturar serotipos no cubiertos en las vacunas previamente comercializadas. Más allá de un mayor requerimiento de asistencia respiratoria que en la planta de pediatría, mediante el uso de sistemas de alto flujo, los pacientes no presentaron complicaciones de interés. En el manejo del drenaje pleural en todos los caso se aplicó uroquinasa, habiéndose objetivado tabiques en cuatro de los siete pacientes que se colocó un drenaje pleural.

Anexo 2, *“Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric*

bronchiolitis: a pilot study”, García-Salido A, Oñoro G, Melen GJ, Gómez-Piña V,

Serrano-González A, Ramírez-Orellana M, Casado-Flores J.Lung. 2015

Feb;193(1):19-23. doi: 10.1007/s00408-014-9663-9. Epub 2014 Oct 30.

Bibliografía

Bibliografía

1. Moreno-Perez D, Andres Martin A, Tagarro Garcia A, et al. Community acquired pneumonia in children: Outpatient treatment and prevention. *Anales de pediatria* 2014;83:217 e1-11.
2. Moreno-Perez D, Andres Martin A, Tagarro Garcia A, et al. Community acquired pneumonia in children: Treatment of complicated cases and risk patients. Consensus statement by the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) and the Spanish Society of Paediatric Chest Diseases (SENP). *Anales de pediatria* 2015;83:217 e1-11.
3. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;50:202-9.
4. Don M, Valent F. Pediatric community-acquired pneumonia in the ambulatory setting. *Eur J Pediatr* 2009;169:771.
5. Grijalva CG, Nuorti JP, Zhu Y, Griffin MR. Increasing incidence of empyema complicating childhood community-acquired pneumonia in the United States. *Clin Infect Dis* 2010;50:805-13.
6. Jabaudon M, Perbet S, Pereira B, et al. Plasma levels of sRAGE, loss of aeration and weaning failure in ICU patients: a prospective observational multicenter study. *PloS one* 2013;8:e64083.
7. Creagh-Brown BC, Burke-Gaffney A, Evans TW. sRAGE: a useful biomarker in acute lung injury? *Critical care medicine* 2011;39:589-90.
8. Bueno Fisher G MH. Neumonía grave. In: J. Casado Flores AS, ed. *Urgencias y tratamiento del niño grave*. Tercera edición ed: Ergon; 2014.
9. Newman RE, Hedican EB, Herigon JC, Williams DD, Williams AR, Newland JG. Impact of a guideline on management of children hospitalized with community-acquired pneumonia. *Pediatrics* 2012;129:e597-604.
10. del Castillo Martin F, Garcia Miguel MJ, Garcia S. [Rational management of acute community-acquired pneumonia]. *Anales espanoles de pediatria* 1999;51:609-16.
11. Montejo Fernandez M, Gonzalez Diaz C, Mintegi Raso S, Benito Fernandez J. Clinical and epidemiological study of community-acquired pneumonia in children aged less than 5 years old. *Anales de pediatria* 2005;63:131-6.
12. Nascimento-Carvalho CM, Madhi SA, O'Brien KL. Review of guidelines for evidence-based management for childhood community-acquired pneumonia in under-5 years from developed and developing countries. *The Pediatric infectious disease journal* 2013;32:1281-2.
13. Deiros Bronte L, Baquero-Artigao F, Garcia-Miguel MJ, Hernandez Gonzalez N, Pena Garcia P, del Castillo Martin F. Parapneumonic pleural effusion: an 11-year review. *Anales de pediatria* 2006;64:40-5.
14. Gilani Z, Kwong YD, Levine OS, et al. A literature review and survey of childhood pneumonia etiology studies: 2000-2010. *Clin Infect Dis* 2012;54 Suppl 2:S102-8.
15. Martin AA, Moreno-Perez D, Miguelez SA, et al. Aetiology and diagnosis of community acquired pneumonia and its complicated forms. *Anales de pediatria* 2012;76:162 e1-18.
16. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *The New England journal of medicine* 2015;372:835-45.
17. Wunderink RG, Waterer GW. Clinical practice. Community-acquired pneumonia. *The New England journal of medicine* 2014;370:543-51.
18. Merino A, Guerra-García F. Neumonía, v.2/2008. *Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico* In; 2008.
19. Chiappini E, Venturini E, Galli L, Novelli V, de Martino M. Diagnostic features of community-acquired pneumonia in children: what's new? *Acta paediatrica* 2013;102:17-24.
20. Andión-Catalán M, Villalobos-Pinto E. Fiebre y tos. Neumonía. Madrid, España: Ergon; 2008.
21. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004;113:701-7.
22. Ferrero F, Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MR, et al. Radiographic findings among children hospitalized with severe community-acquired pneumonia. *Pediatric pulmonology* 2010;45:1009-13.
23. McCulloh RJ, Koster MP, Yin DE, et al. Evaluating the use of blood cultures in the management of children hospitalized for community-acquired pneumonia. *PloS one* 2015;10:e0117462.
24. Cabeza B, Garcia Ruiz S, Gonzalez-Abad MJ, et al. [Staphylococcus aureus infections in the intensive care unit: clinical and epidemiological characteristics]. *Anales de pediatria* 2012;77:403-12.
25. De la Torre Espí M, Pérez Gorricho B. Antibioterapia empírica ante sospecha de neumonía adquirida en la comunidad. In: Jesús HiuN, ed. *Guía clínica de "Antibioterapia empírica por sospecha de infección"*. 6ª Edición. ed; 2011.
26. Espinola Docio B, Casado Flores J, de la Calle Cabrera T, Lopez Guinea A, Serrano Gonzalez A. Pleural effusion in children with pneumonia: a study of 63 cases. *Anales de pediatria* 2008;69:210-4.
27. Serrano González A DLG. Derrame pleural en el niño. In: Casado Flores J SGA, ed. *Urgencias y tratamiento del Niño grave*: Ergon; 2014:407-4015.

28. Proesmans M, Gijsens B, Van de Wijdeven P, et al. Clinical outcome of parapneumonic empyema in children treated according to a standardized medical treatment. *Eur J Pediatr* 2014;173:1339-45.
29. Krenke K, Sanocki M, Urbankowska E, et al. Necrotizing Pneumonia and Its Complications in Children. *Advances in experimental medicine and biology* 2014.
30. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992;267:14998-5004.
31. van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock (Augusta, Ga)* 2009;31:280-4.
32. Garcia-Salido A, Onoro G, Melen GJ, et al. Serum sRAGE as a Potential Biomarker for Pediatric Bronchiolitis: A Pilot Study. *Lung* 2014.
33. Yerkovich ST, Chang AB, Carroll ML, Petsky HL, Scrivener G, Upham JW. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) is present at high concentrations in the lungs of children and varies with age and the pattern of lung inflammation. *Respirology* 2012;17:841-6.
34. Takahashi G, Hoshikawa K, Matsumoto N, et al. Changes in serum S100A12 and sRAGE associated with improvement of the PaO₂/FiO₂ ratio following PMX-DHP therapy for postoperative septic shock. *Eur Surg Res* 2011;47:135-40.
35. Mahajan N, Dhawan V, Malik S, Jain S. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol* 2010;145:589-91.
36. Kim JK, Park S, Lee MJ, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis. *Atherosclerosis* 2011;220:208-14.
37. Mahajan N, Malik N, Bahl A, Sharma Y, Dhawan V. Correlation among soluble markers and severity of disease in non-diabetic subjects with pre-mature coronary artery disease. *Molecular and cellular biochemistry* 2009;330:201-9.
38. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clinical science* 2009;116:621-37.
39. van Zoelen MA, van der Poll T. Targeting RAGE in sepsis. *Critical care* 2008;12:103.
40. Arce-Mendoza A, Rodriguez-de Ita J, Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG. Expression of CD64, CD206, and RAGE in adherent cells of diabetic patients infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of medical research* 2008;39:306-11.
41. Moser B, Szabolcs MJ, Ankersmit HJ, et al. Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007;7:293-302.
42. Creagh-Brown BC, Quinlan GJ, Evans TW, Burke-Gaffney A. The RAGE axis in systemic inflammation, acute lung injury and myocardial dysfunction: an important therapeutic target? *Intensive care medicine* 2010;36:1644-56.
43. Buckley ST, Ehrhardt C. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:917108.
44. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993;91:2155-68.
45. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993;143:1699-712.
46. Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, et al. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Critical care* 2008;12:201.
47. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 2009;59:249-55.
48. Fang F, Lue LF, Yan S, et al. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2009;24:1043-55.
49. Lee EJ, Park JH. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics & informatics* 2013;11:224-9.
50. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16:2363-72.
51. van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in hmgb1 induced inflammation in vivo. *Shock (Augusta, Ga)* 2008.
52. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1823-32.

53. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 2001;50:1495-504.
54. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994;150:710-6.
55. Igonin AA, Armstrong VW, Shipkova M, Lazareva NB, Kukes VG, Oellerich M. Circulating cytokines as markers of systemic inflammatory response in severe community-acquired pneumonia. *Clinical biochemistry* 2004;37:204-9.
56. Michelow IC, Katz K, McCracken GH, Hardy RD. Systemic cytokine profile in children with community-acquired pneumonia. *Pediatric pulmonology* 2007;42:640-5.
57. Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2009;14:1403-13.
58. Li Y, Wu R, Zhao S, et al. RAGE/NF-kappaB pathway mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar type I epithelial cells isolated from neonate rats. *Inflammation* 2014;37:1623-9.
59. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology* 2014;2:411-29.
60. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:993-1007.
61. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:191-231.
62. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003;170:3233-42.
63. Musumeci D, Roviello GN, Montesarchio D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacology & therapeutics* 2014;141:347-57.
64. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology* 2010;28:367-88.
65. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scandinavian journal of immunology* 2005;61:1-9.
66. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 2006;29:1420-32.
67. Srikanth V, Maczurek A, Phan T, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2009.
68. Towler DA. Vascular calcification: it's all the RAGE! *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011;31:237-9.
69. Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, Davi G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Internal and emergency medicine* 2009;4:389-401.
70. Kneyber MC, Gazendam RP, Niessen HW, et al. Mechanical ventilation during experimental sepsis increases deposition of advanced glycation end products and myocardial inflammation. *Critical care* 2009;13:R87.
71. Kanazawa H, Kyoh S, Asai K, Hirata K. Validity of measurement of two specific biomarkers for the assessment of small airways inflammation in asthma. *J Asthma* 2010;47:400-6.
72. Geffter JV, Shaufl AL, Fink MP, Delude RL. Comparison of distinct protein isoforms of the receptor for advanced glycation end-products expressed in murine tissues and cell lines. *Cell Tissue Res* 2009;337:79-89.
73. Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:1-5.
74. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 2008;22:3716-27.
75. Jing RR, Cui M, Sun BL, Yu J, Wang HM. Tissue-specific expression profiling of receptor for advanced glycation end products and its soluble forms in esophageal and lung cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14:355-61.
76. Zhao DC, Lu HW, Huang ZH. Association between the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology* 2015;20:614-24.
77. Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, Sapin V, Pereira B, Constantin JM. Association between intraoperative ventilator settings and plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients without pre-existing lung injury. *Respirology* 2015.
78. Jabaudon M, Blondonnet R, Roszyk L, et al. Soluble Forms and Ligands of the Receptor for Advanced Glycation End-Products in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: An Observational Prospective Study. *PLoS one* 2015;10:e0135857.
79. Nicolls MR, Laubach VE. Traumatic brain injury: lungs in a RAGE. *Science translational medicine* 2014;6:252fs34.

80. Kuipers MT, Aslami H, Tuinman PR, et al. The receptor for advanced glycation end products in ventilator-induced lung injury. *Intensive care medicine experimental* 2014;2:22.
81. Liu X, Chen Q, Shi S, et al. Plasma sRAGE enables prediction of acute lung injury after cardiac surgery in children. *Critical care* 2012;16:R91.
82. Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respiratory medicine* 2011;105:329-36.
83. Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, et al. Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Critical care medicine* 2011;39:480-8.
84. Griffiths MJ, McAuley DF. RAGE: a biomarker for acute lung injury. *Thorax* 2008;63:1034-6.
85. Reynolds PR, Schmitt RE, Kasteler SD, et al. Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;42:545-51.
86. Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davi G. Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry* 2009;16:940-52.
87. Dettoraki A, Gil AP, Spiliotis BE. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2009;22:895-904.
88. Kajikawa M, Nakashima A, Fujimura N, et al. Ratio of serum levels of AGEs to soluble form of RAGE is a predictor of endothelial function. *Diabetes Care* 2015;38:119-25.
89. Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Critical care* 2011;15:231.
90. Tam XH, Shiu SW, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ, Tan KC. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. *Clinical science (London, England : 1979)* 2011;120:81-9.
91. El-Seify MY, Fouda EM, Nabih ES. Serum level of soluble receptor for advanced glycation end products in asthmatic children and its correlation to severity and pulmonary functions. *Clinical laboratory* 2014;60:957-62.
92. Garcia-Salido A, Onoro G, Melen GJ, et al. Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric bronchiolitis: a pilot study. *Lung* 2015;193:19-23.
93. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *Journal of Clinical Investigation* 2004;113:1641-50.
94. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 2005;15:16R-28R.
95. Bopp C, Hofer S, Weitz J, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *The Journal of surgical research* 2008;147:79-83.
96. Xie J, Mendez JD, Mendez-Valenzuela V, Aguilar-Hernandez MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular signalling* 2013;25:2185-97.
97. Fuentes E, Rojas A, Palomo I. Role of multiligand/RAGE axis in platelet activation. *Thrombosis research* 2014;133:308-14.
98. Hamasaki MY, Barbeiro HV, de Souza HP, Machado MC, da Silva FP. sRAGE in septic shock: a potential biomarker of mortality. *Revista Brasileira de terapia intensiva* 2014;26:392-6.
99. Marinakis E, Bagkos G, Piperi C, Roussou P, Diamanti-Kandarakis E. Critical role of RAGE in lung physiology and tumorigenesis: a potential target of therapeutic intervention? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2014;52:189-200.
100. Menini T, Ikeda H, Kimura S, Gugliucci A. Circulating soluble RAGE increase after a cerebrovascular event. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2014;52:109-16.
101. Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, et al. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. *The journal of trauma and acute care surgery* 2015;78:1086-94.
102. Brodska H, Malickova K, Valenta J, Fabio A, Drabek T. Soluble receptor for advanced glycation end products predicts 28-day mortality in critically ill patients with sepsis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2013;73:650-60.
103. Cheng Y, Zhong J, Xiang Y, Zeng F, Cai D, Zhao L. Soluble receptor for advanced glycation end products in critically ill patients and its associations with other clinical markers and 28-day mortality. *Clinical interventions in aging* 2014;9:1981-6.
104. Jabaudon M, Hamroun N, Roszyk L, et al. Effects of a recruitment maneuver on plasma levels of soluble RAGE in patients with diffuse acute respiratory distress syndrome: a prospective randomized crossover study. *Intensive care medicine* 2015;41:846-55.
105. van Zoelen MA, van der Sluijs KF, Achoui A, et al. Receptor for advanced glycation end products is detrimental during influenza A virus pneumonia. *Virology* 2009;391:265-73.
106. Narvaez-Rivera RM, Rendon A, Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG. gSoluble RAGE as a severity marker in community acquired pneumonia associated sepsis. *BMC infectious diseases* 2012;12:15.

107. Shemirani F, Yazdanparast R. The interplay between hyperglycemia-induced oxidative stress markers and the level of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in K562 cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2014;393:179-86.
108. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2009;11:R39.
109. Myles A, Viswanath V, Singh YP, Aggarwal A. Soluble receptor for advanced glycation endproducts is decreased in patients with juvenile idiopathic arthritis (ERA category) and inversely correlates with disease activity and S100A12 levels. *The Journal of rheumatology* 2011;38:1994-9.
110. Giannini C, D'Adamo E, de Giorgis T, et al. The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. *Pediatric nephrology* 2012;27:269-75.
111. Salonen KM, Ryhanen SJ, Forbes JM, et al. Circulating concentrations of soluble receptor for AGE are associated with age and AGER gene polymorphisms in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2014;37:1975-81.
112. Buschmann K, Tschada R, Metzger MS, et al. RAGE controls leukocyte adhesion in preterm and term infants. *BMC immunology* 2014;15:53.
113. Drinda S, Franke S, Eidner T, et al. Decreased RAGE expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 2009;27:483-90.
114. Frommhold D, Kamphues A, Dannenberg S, et al. RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC immunology* 2011;12:56.
115. Wang Y, Wang H, Piper MG, et al. sRAGE induces human monocyte survival and differentiation. *J Immunol* 2010;185:1822-35.
116. Sukkar MB, Wood LG, Tooze M, et al. Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and COPD. *The European respiratory journal* 2012;39:721-9.
117. de Lama Caro-Paton G, Garcia-Salido A, Iglesias-Bouzas MI, et al. Extreme reactive thrombocytosis in a healthy 6 year-old child. *Anales de pediatria* 2014;81:318-21.
118. Mauri T, Masson S, Pradella A, et al. Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts are associated with severity of lung dysfunction in ARDS patients. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2010;222:105-12.
119. Wu J, Jin YU, Li H, et al. Evaluation and significance of C-reactive protein in the clinical diagnosis of severe pneumonia. *Experimental and therapeutic medicine* 2015;10:175-80.
120. Ge X, Xu XY, Feng CH, Wang Y, Li YL, Feng B. Relationships among serum C-reactive protein, receptor for advanced glycation products, metabolic dysfunction, and cognitive impairments. *BMC neurology* 2013;13:110.
121. Bobek D, Grcevic D, Kovacic N, Lukic IK, Jelusic M. The presence of high mobility group box-1 and soluble receptor for advanced glycation end-products in juvenile idiopathic arthritis and juvenile systemic lupus erythematosus. *Pediatric rheumatology online journal* 2014;12:50.
122. Cheng DT, Kim DK, Cockayne DA, et al. Systemic soluble receptor for advanced glycation endproducts is a biomarker of emphysema and associated with AGER genetic variants in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;188:948-57.
123. Coxson HO, Dirksen A, Edwards LD, et al. The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2013;1:129-36.
124. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews Immunology* 2012;12:191-200.
125. Quantikine®ELISA Human RAGE Immunoassay. 2015. (Accessed 2015, at <http://www.rndsystems.com/pdf/drg00.pdf>.)
126. Clynes R, Moser B, Yan SF, Ramasamy R, Herold K, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Current molecular medicine* 2007;7:743-51.
127. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Current molecular medicine* 2007;7:711-24.
128. Kihm LP, Wibisono D, Muller-Krebs S, et al. RAGE expression in the human peritoneal membrane. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008;23:3302-6.
129. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. *Journal of leukocyte biology* 2009;86:505-12.
130. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *Journal of translational medicine* 2009;7:17.
131. Creagh-Brown BC, Quinlan GJ, Evans TW. RAGE inhibition: healthy or harmful? *Critical care medicine* 2010;38:1487-90.

132. Fang F, Lue LF, Yan S, et al. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2010;24:1043-55.
133. Lanati N, Emanuele E, Brondino N, Geroldi D. Soluble RAGE-modulating drugs: state-of-the-art and future perspectives for targeting vascular inflammation. *Current vascular pharmacology* 2010;8:86-92.
134. Curran CS, Bertics PJ. Human eosinophils express RAGE, produce RAGE ligands, exhibit PKC-delta phosphorylation and enhanced viability in response to the RAGE ligand, S100B. *International immunology* 2011;23:713-28.
135. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in biochemical sciences* 2011;36:625-32.
136. van Zoelen MA, Achouiti A, van der Poll T. RAGE during infectious diseases. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2011;3:1119-32.
137. van Zoelen MA, Achouiti A, van der Poll T. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection. *Critical care* 2011;15:208.
138. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol* 2011;186:3248-57.
139. Uhle F, Noulard D, Little S, et al. Plasmatic isoforms of cytokeratin 18 and RAGE after severe trauma: a longitudinal cohort study. *The journal of trauma and acute care surgery* 2014;77:577-84.
140. Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2006;19:1437-45.
141. Ramasamy R, Yan SF, Herold K, Clynes R, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1126:7-13.
142. Basta G, Leonardis D, Mallamaci F, et al. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney international* 2010;77:225-31.
143. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochemical pharmacology* 2010;79:1379-86.
144. Sabbagh MN, Agro A, Bell J, Aisen PS, Schweizer E, Galasko D. PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 2011;25:206-12.
145. Huang M, Que Y, Shen X. Correlation of the plasma levels of soluble RAGE and endogenous secretory RAGE with oxidative stress in pre-diabetic patients. *Journal of diabetes and its complications* 2015;29:422-6.
146. Koucky M, Germanova A, Kalousova M, et al. Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response. *Journal of perinatal medicine* 2010;38:589-96.
147. Hergrueter AH, Nguyen K, Owen CA. Matrix metalloproteinases: all the RAGE in the acute respiratory distress syndrome. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L512-5.
148. Solan PD, Dunsmore KE, Denenberg AG, Odoms K, Zingarelli B, Wong HR. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. *Critical care medicine* 2012;40:379-87.
149. Jensen LJ, Munk K, Flyvbjerg A, Botker HE, Bjerre M. Soluble receptor of advanced glycation end-products in patients with acute myocardial infarction treated with remote ischaemic conditioning. *Clinical laboratory* 2015;61:323-8.
150. Prakash J, Pichchadze G, Trofimov S, Livshits G. Age and genetic determinants of variation of circulating levels of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the general human population. *Mechanisms of ageing and development* 2015;145:18-25.
151. Arabi YM, Dehbi M, Rishu AH, et al. sRAGE in diabetic and non-diabetic critically ill patients: effects of intensive insulin therapy. *Critical care* 2011;15:R203.
152. Kwon JH, Kim YH, Kwon JY, Park YW. Clinical significance of serum sRAGE and esRAGE in women with normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of perinatal medicine* 2011;39:507-13.
153. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Maeda S, Yamagishi S. Increased levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and high mobility group box 1 (HMGB1) are associated with death in patients with acute respiratory distress syndrome. *Clinical biochemistry* 2011;44:601-4.
154. Leonardis D, Basta G, Mallamaci F, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end product (sRAGE) and left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease (CKD). *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2012;22:748-55.
155. Riehl A, Nemeth J, Angel P, Hess J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell communication and signaling : CCS* 2009;7:12.
156. Romero R, Espinoza J, Hassan S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *Journal of perinatal medicine* 2008;36:388-98.

157. Briot R, Frank JA, Uchida T, Lee JW, Calfee CS, Matthay MA. Elevated levels of the receptor for advanced glycation end products, a marker of alveolar epithelial type I cell injury, predict impaired alveolar fluid clearance in isolated perfused human lungs. *Chest* 2009;135:269-75.
158. Guo WA, Knight PR, Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Intensive care medicine* 2012;38:1588-98.
159. Gopal P, Reynaert NL, Scheijen JL, et al. Association of plasma sRAGE, but not esRAGE with lung function impairment in COPD. *Respiratory research* 2014;15:24.
160. D'Adamo E, Giannini C, Chiavaroli V, et al. What is the significance of soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in liver steatosis in obese prepubertal children? *Antioxidants & redox signaling* 2011;14:1167-72.
161. Gonzalez-Lopez A, Aguirre A, Lopez-Alonso I, et al. MMP-8 deficiency increases TLR/RAGE ligands S100A8 and S100A9 and exacerbates lung inflammation during endotoxemia. *PloS one* 2012;7:e39940.
162. Shah RJ, Bellamy SL, Lee JC, et al. Early plasma soluble receptor for advanced glycation end-product levels are associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2013;13:754-9.
163. Calfee CS, Budev MM, Matthay MA, et al. Plasma receptor for advanced glycation end-products predicts duration of ICU stay and mechanical ventilation in patients after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2007;26:675-80.
164. Christaki E, Lazaridis N, Opal SM. Receptor for advanced glycation end products in bacterial infection: is there a role for immune modulation of receptor for advanced glycation end products in the treatment of sepsis? *Current opinion in infectious diseases* 2012;25:304-11.
165. Millo JL, Schultz MJ, Williams C, et al. Compartmentalisation of cytokines and cytokine inhibitors in ventilator-associated pneumonia. *Intensive care medicine* 2004;30:68-74.
166. Endeman H, Meijvis SC, Rijkers GT, et al. Systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *The European respiratory journal* 2011;37:1431-8.
167. Menendez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, et al. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia. *Chest* 2012;141:1537-45.
168. Sadik NA, Mohamed WA, Ahmed MI. The association of receptor of advanced glycated end products and inflammatory mediators contributes to endothelial dysfunction in a prospective study of acute kidney injury patients with sepsis. *Molecular and cellular biochemistry* 2012;359:73-81.
169. Achouiti A, de Vos AF, de Beer R, Florquin S, van 't Veer C, van der Poll T. Limited role of the receptor for advanced glycation end products during *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Journal of innate immunity* 2013;5:603-12.
170. Hochstrasser T, Weiss E, Marksteiner J, Humpel C. Soluble cell adhesion molecules in monocytes of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Experimental gerontology* 2010;45:70-4.
171. Xanthis A, Hatzitolios A, Fidani S, Befani C, Giannakoulas G, Koliakos G. Receptor of advanced glycation end products (RAGE) positively regulates CD36 expression and reactive oxygen species production in human monocytes in diabetes. *Angiology* 2009;60:772-9.
172. van Zoelen MA, Schouten M, de Vos AF, et al. The receptor for advanced glycation end products impairs host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2009;182:4349-56.
173. van Zoelen MA, Schmidt AM, Florquin S, et al. Receptor for advanced glycation end products facilitates host defense during *Escherichia coli*-induced abdominal sepsis in mice. *The Journal of infectious diseases* 2009;200:765-73.
174. Don M, Canciani M, Korppi M. Community-acquired pneumonia in children: what's old? What's new? *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 2010;99:1602-8.
175. Launes C, de-Sevilla MF, Selva L, Garcia-Garcia JJ, Pallares R, Munoz-Almagro C. Viral coinfection in children less than five years old with invasive pneumococcal disease. *The Pediatric infectious disease journal* 2012;31:650-3.
176. Cevey-Macherel M, Galetto-Lacour A, Gervais A, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *Eur J Pediatr* 2009;168:1429-36.
177. Chan MC, Hsu JY, Liu HH, et al. Effects of prone position on inflammatory markers in patients with ARDS due to community-acquired pneumonia. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2007;106:708-16.
178. Jose R, Williams A, Sulikowski M, Brealey D, Brown J, Chambers R. Regulation of neutrophilic inflammation in lung injury induced by community-acquired pneumonia. *Lancet (London, England)* 2015;385 Suppl 1:S52.
179. Don M, Valent F. Pediatric community-acquired pneumonia in the ambulatory setting. *European journal of pediatrics* 2010;169:771.
180. Ramirez P, Ferrer M, Marti V, et al. Inflammatory biomarkers and prediction for intensive care unit admission in severe community-acquired pneumonia. *Critical care medicine* 2011;39:2211-7.

181. Salomao R, Brunialti MK, Gomes NE, et al. Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Critical care medicine* 2009;37:132-9.
182. Pullerits R, Brissert M, Jonsson IM, Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis and rheumatism* 2006;54:3898-907.
183. Bucher HC, Guyatt GH, Cook DJ, Holbrook A, McAlister FA. Users' guides to the medical literature: XIX. Applying clinical trial results. A. How to use an article measuring the effect of an intervention on surrogate end points. Evidence-Based Medicine Working Group. *Jama* 1999;282:771-8.
184. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2010;50:202-9.
185. Noguchi T, Sado T, Naruse K, et al. Evidence for activation of Toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth. *Mediators of inflammation* 2010;2010:490406.
186. Bastek JA, Brown AG, Foreman MN, et al. The soluble receptor for advanced glycation end products can prospectively identify patients at greatest risk for preterm birth. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2012;25:1762-8.
187. Obando I, Munoz-Almagro C, Arroyo LA, et al. Pediatric parapneumonic empyema, Spain. *Emerging infectious diseases* 2008;14:1390-7.
188. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009;374:1543-56.
189. Ware LB, Koyama T, Zhao Z, et al. Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical care* 2013;17:R253.
190. Gu W, Xu Z, Qi F, Sang Z, Wang C, Li F. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with acute respiratory distress syndrome. *International journal of clinical and experimental medicine* 2014;7:5558-62.
191. sAccacha S, Rosenfeld W, Jacobson A, et al. Plasma advanced glycation end products (AGEs), receptors for AGEs and their correlation with inflammatory markers in middle school-age children. *Hormone research in paediatrics* 2013;80:318-27.